ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA
VOL. IX, 20 SECTIO D 1954

Z Centralnego Laboratorium Klinicznego Państw. Szpitala Klinicznego w Lublinie
Kierownik: doc. dr med. Jerzy Krawczyński

Jerzy KRAWCZYŃSKI

Wpływ kationów akrydynowych na białka surowicy i niektóre enzymy

Влияние акридиновых катионов на белки сыворотки и некоторые энзимы

Influence of acridine cations on serum proteins and some enzymes

1. Wstęp

Celem niniejszej pracy było:

1. Przebadanie warunków powstawania połączeń między białkami surowicy a niektórymi barwnikami akrydynowymi,
2. Zastosowanie barwników akrydynowych do określania zmian ilościowych, zachodzących w obrębie widma białkowego surowicy osób zdrowych, i
3. Przebadanie wpływu jaki wywierają barwniki akrydynowe na niektóre enzymy.

Punktem wyjścia dla naszych doświadczeń były badania Gorodskajej (1), Ryżkowa i Smirnowej (2), w których zajmowano się oczyszczaniem wirusa choroby mozaikowej tytoniu przy pomocy riwanolu (2.5 diamino — 7 etoksy akrydyny), badania Hořejši (3) omawiające sposób otrzymania γ-globulin z surowicy przy użyciu riwanolu, oraz Quastela i Wheatley'a (4), Manifolda (5), Specka i Evansa (6), Bowarnicka i Lindsaya, Hellermana (7, 8, 9) i innych dotyczące wpływu akryflawiny i atebryny na niektóre enzymy, a także obserwacje własne, poczynione przy zastosowaniu riwanolu do badań chemiczno-klinicznych opisane w tymczasowym doniesieniu (10).

2. Część doświadczalna

2. 1. Materiał doświadczalny.

Badania wykonano na:

A. Świeżej surowicy ludzkiej, względnie surowicy przechowywanej najdłużej 24 godz. w temp. 4° C.

B. Albuminie surowiczej człowieka wypreparowanej wg Cohna (11) przez Instytut Hematologiczny w Warszawie.

C. Tzw Frakcji II-R/2 wypreparowanej wg Hořejši (3), składającej się z β i γ-globulin.

Do badań użyto następujących preparatów akrydynowych:

A. Rivanolu (2,5 diamino — 7 etoksyakrydyny) „Bayer".

B. Trypaflawiny (2.8 — diamino — 10 metylochloroakrydyny) — „Bayer".

C. Akryflawiny (mieszaniny 2,8 diaminoakrydyny — z trypaflawiną w stosunku 3:1) — „Abbot".

D. Atebryny (2-chloro-5-) dietylo — 1 metyl) butyl-amino — 7 metoksyakrydyny) — „Bayer".

W pracy przyjęto nomenklaturę podaną w podręcznikach Gaedego (12) i Mitchella (13).

Do badań enzymologicznych użyto:

a. Ureazy „Squibb".

b. Diastazy „Witte".

c. Trypsyny krystalicznej wypreparowanej wg Northropa (14).

d. Preparatu dehydrogenazy kwasu bursztynowego otrzymanego wg Balla (15).

Badania chemiczno-kliniczne przeprowadzono na 146 osobach zdrowych w wieku od 18 do 54 lat, przeważnie kobietach.

2. 2. Metodyka badań

a. Białka oznaczano ilościowo metodą biuretową w modyfikacji Kingsleya (16).

b. Badania elektroforetyczne przeprowadzono wg metody Flynn, da Mayo (17) w modyfikacji Krystosika (18) oraz wg Slatera i Kunkela (19).

c. Rejestrację optyczną proteinogramów wykonano wg Optla i współ. (20) we własnej modyfikacji (21).

d. Zawartość procentową poszczególnych frakcji wyliczano planimetrycznie tzw. metodą prostopadłych opisaną przez Ardryégo (22).

e. Badania konduktometryczne przeprowadzono na konduktometrze wg Kohlrauscha, stosując metodykę opisaną przez Zvonička (23).

f. pH określano na pH-metrze F-my Radiometr 21 b z elektrodą szklaną i kalomelową.

g. Frakcję II-R oznaczano wg metodyki podanej w tymczasowym doniesieniu.

h. Aktywność ureazy określano metodą mikrodyfuzji wg Slavika i Smetany (24) we własnej modyfikacji (25).

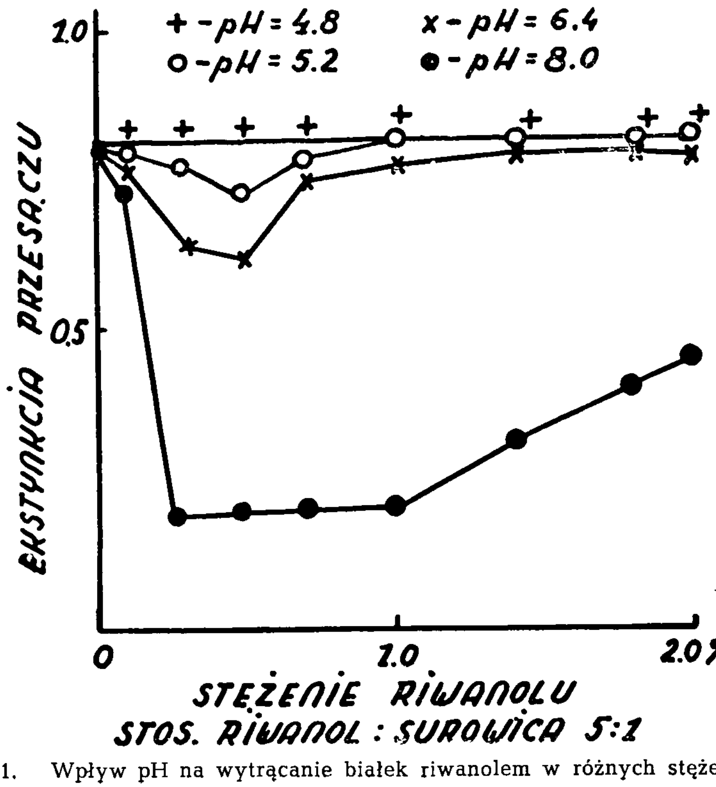
i. Aktywność diastazy wg Wohlgemutha (26).

j. Aktywność trypsyny wg Slavika i Smetany (27).
k. Aktywność dehydrogenazy kwasu bursztynowego wg Pihara (28).

2. 3. Wyniki doświadczeń

2. 3. 1. *Wpływ pH na wytrącanie białek surowicy riwanolem użytym w różnych stężeniach.*

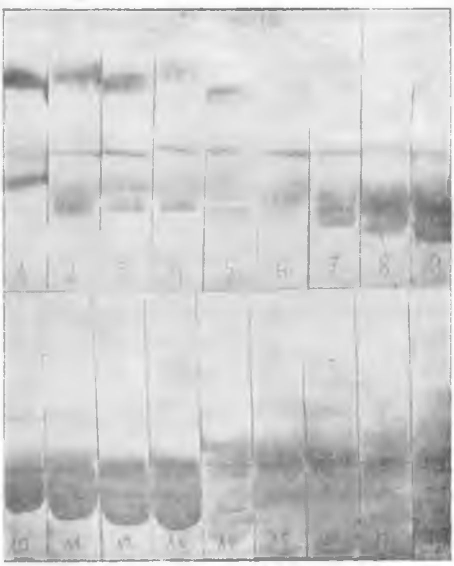
Riwanol rozpuszczano w buforach cytrynianowych o pH 4,8, 5,2 i 6,4 oraz w wodzie. Bufory sporządzono wg Sörensöna (29). Riwanolu używano w zakresie 0,1 do 2,0%. pH wodnych roztworów riwanolu wynosiło 7,8—8,0. Roztwory riwanolu dawano do surowicy w stosunku 5:1. Następnie, niezależnie od tego czy powstał osad czy też nie, zawartość probówki przesączano przez gęsty sączek używając ponadto „Super-Cellu" jako środka ułatwiającego sączenie. W 1,2 ml. przesączu oznaczono zawartość białka metodą biuretową. Stwierdzono, że przy pH 4.8 w całym zakresie użytych stężeń riwanolu, nie powstaje osad, a zawartość białka w przesączu



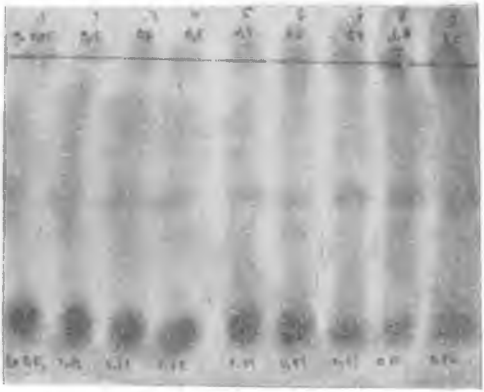
Ryc. 1. Wpływ pH na wytrącanie białek riwanolem w różnych stężeniach.

jest prawie jednakowa. Przy pH 5,2 i 6,4 również nie stwierdzono powstawania osadu, ale przy stężeniu riwanolu ok. 0,5% zauważono, że zawartość białka w przesączu jest nieco mniejsza. (Ryc. 1). Badania elektroforetyczne wykazały we wszystkich próbkach obecność w przesączu frakcji albuminowej, oraz frakcji α, β i γ-globulinowych, podobnie jak w surowicy kontrolnej.

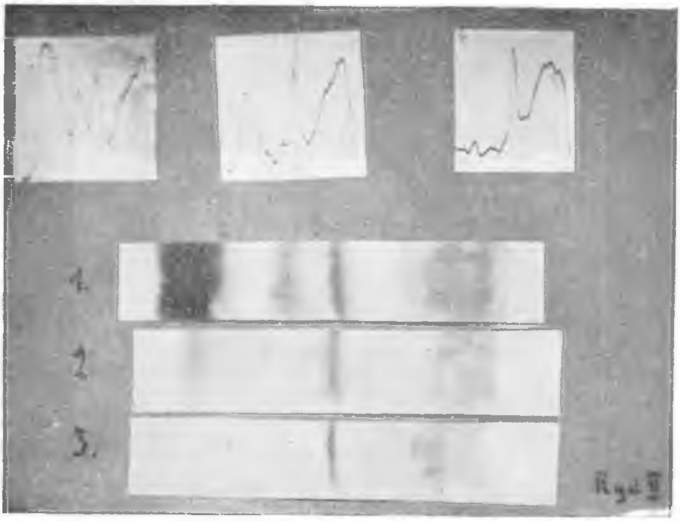
Przy pH 8,0 w granicach stężeń riwanolu 0,1—0,3% następuje w przesączu szybki spadek zawartości białka. W granicach 0,3—0,7% zawartość białka utrzymuje się prawie na tym samym poziomie, a przy użyciu stężeń 0,7—2,0% powoli wzrasta. Badanie elektroforetyczne wykazuje, że kolejno ubywają z przesączu: część albumin, α-globuliny, druga część albumin i część β-globulin. Pozostałe w przesączu β-globuliny i γ-globuliny początkowo dość ostro oddzielone od siebie zaczynają przy większych stężeniach riwanolu rozlewać się na proteinogramie. W całym zakresie użytych stężeń, po dodaniu riwanolu zauważono powstawanie mniej lub więcej obfitego osadu. (Ryc. 2, 3, 4).



Ryc. 2. Wytrącanie białek surowicy riwanolem przy pH = 7,8—8,0. Stężenie riwanolu od 0,1 do 2,0%.



Ryc. 3. Wytrącanie białek surowicy riwanolem przy pH = 4,8. Stężenie riwanolu od 0,1 do 2,0%.

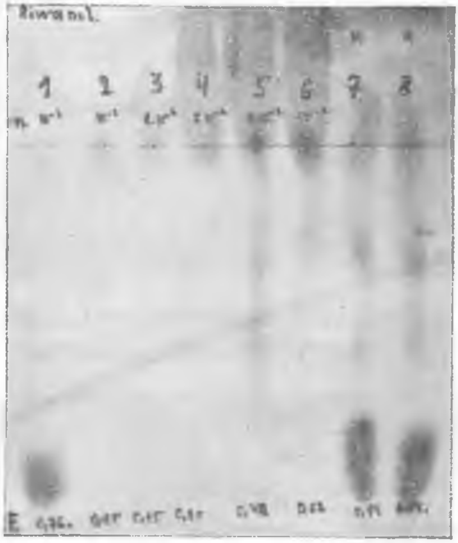


Ryc. 4. Wytrącanie białek surowicy riwanolem przy pH = 7,8. I. 0,1% riwanol, II. 0,2% riwanol, III. 0,3% riwanol (Fr. II-R).

2. 3. 2. *Wytrącanie białek surowicy barwnikami akrydynowymi przy stałym pH.*

Równocząsteczkowe roztwory barwników akrydynowych dodawano do surowicy w stosunku 5:1. pH roztworów utrzymywano w granicach 8,1—8,3. Zawartość białek w przesączu oznaczono sposobem podanym wyżej. Przebieg wytrącania kontrolowano elektroforetycznie.

A. Riwanol: przy użyciu 0,01 M roztworu pozostają w przesączu tylko β i γ-globuliny. Przy 0,05 ponownie poja-



Ryc. 5. Wytrącanie białek surowicy riwanolem przy stałym pH = 8,2.



Ryc. 6. Wytrącanie białek surowicy akryflawiną przy stałym pH = 8,2.

wiają się albuminy. W stężeniach wyższych frakcje zlewają się.

B. Akryflawina i trypaflawina: β i γ-globuliny pozostają w przesączu począwszy od stężenia 0,02 M. Przy 0,05 M. ponownie pojawiają się albuminy. Poszczególne frakcje są dość dobrze rozdzielone nawet przy stężeniu 0,1 M.

C. Atebryna w każdym z użytych stężeń nie wytrąca białek surowicy. (Ryc. 5, 6, 7, 8, 9, 10). (Tabl. I).

Tabela I

Stężenie w M	Riwanol E	Akryflawina E	Trypaflawina E	Atebryna E
0	0.84	0.84	0.84	0.84
0.001	0.76	0.77	0.76	0.82
0.01	0.15	0.26	0.26	0.81
0.02	0.15	0.15	0.17	0.81
0.05	0.20	0.31	0.30	0.80
0.08	0.42	0.39	0.40	0.81
0.1	0.53	0.57	0.56	0.81

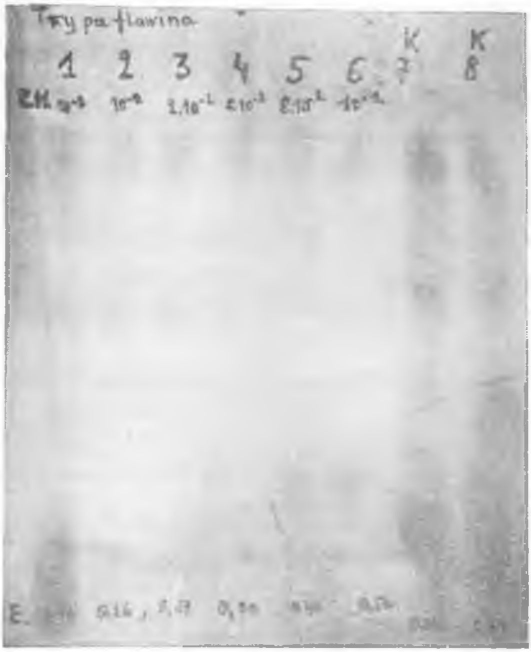
Tabl. Nr I. Porównanie wytrącającego działania barwników akrydynowych na białka surowicy przy stałym pH.

2. 3. 3. *Wpływ pH na niewytrącającą się barwnikami akrydynowymi frakcję białkową surowicy.*

Do trzech probówek w których umieszczono po 5 ml przesączu zawierającego frakcję II-R dodano: do I:1 ml 1,0 n HCl; do II-giej; 1 ml 1,0 n NaOH; a do III-ciej: 1 ml wody. Z każdej próbki naniesiono na pasek bibuły Whatman Nr 4 i przeprowadzono badanie elektroforetyczne. Nie stwierdzono jakichkolwiek zmian w składzie białkowym poszczególnych próbek.

2. 3. 4. *Wytrącanie białek surowicy 0,01 M roztworami barwników akrydynowych przy zmiennym pH.*

Barwniki akrydynowe rozpuszczano w buforach cytrynianowych i boranowych sporządzonych wg Sörensöna (29). Okre-



Ryc. 7. Wytrącanie białek surowicy trypaflawiną przy stałym pH = 8,2.

ślanie zawartości białek w przesączu i kontrolę elektroforetyczną przeprowadzono jak wyżej.

A. Riwanol: Największa ilość białka wytrąca się z surowicy przy pH 8,0. Pozostają wtedy w przesączu tylko β i γ-globuliny.

Kolejność zanikania z przesączu poszczególnych frakcji jest taka sama, jak opisana w punkcie 2. 3. 1. W zakresie pH powyżej 8,0 ponownie pojawiają się w przesączu albuminy. Przy pH 10,4 frakcje rozlewają się.

B. Trypaflawina: Największe wytrącanie białek surowicy jest przy pH 8,2. Frakcje białkowe zachowują się podobnie, jak przy użyciu riwanolu. Począwszy od pH 9,1 frakcje na proteinogramie zaczynają się rozlewać.

C. Akryflawina: Zachowuje się tak samo jak trypaflawina.

D. Atebryna: W zakresie pH 4,3—9,2 nie wytrąca zupełnie białek surowicy. (Ryc. 11, 12, 13, 14).

2. 3. 5. *Działanie kwasu solnego na białka wytrącone 0,01 M roztworem barwnika.*

Białka surowicy wytrącono przy pH 8,1, 0,01 M roztworem barwnika dodanym do surowicy w stosunku 5:1. Wytrącone białko rozpuszczano w 0,01 n HCl i oznaczono reakcją biuretową ilość rozpuszczonego białka. Oznaczono też zawartość białka w przesączach i przeprowadzono badania elektroforetyczne zarówno przesączu, jak i rozpuszczonego w 0,01 n HCl osadu. Ilościowe oznaczanie zawartości białka wykazało, że obie frakcje — wytrącająca się i pozostająca w roztworze dokładnie bilansują się pod względem ilościowym. Badaniem elektroforetycznym stwierdzono to samo również i pod względem jakościowym. (Tabl. II).



Ryc. 8. Wytrącanie białek surowicy atebryną przy stałym pH = 8,2.

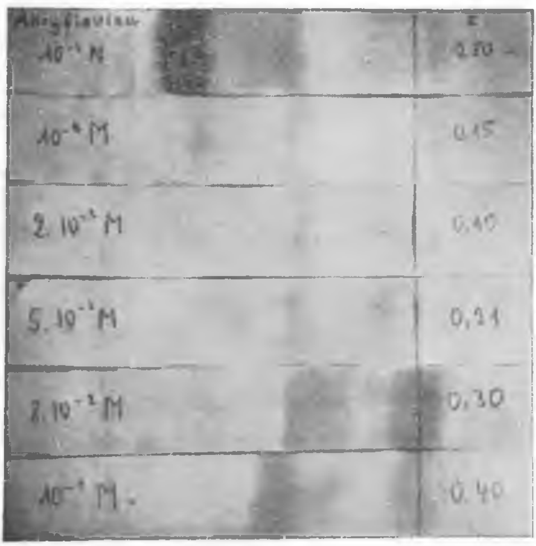
Tabela II

Barwnik	1	2	3	4
	Przesacz E	Rozpuszczony w 0.1n.HCl osad E	Rubryka 1+2 E	Białka całk. E
Riwanol	0.093	0.370	0.463	0.456
Akryflawina	0.140	0.312	0.452	0.456
Trypaflawina	0.145	0.315	0.460	0.456
Atebryna	0.455	0.000	0.455	0.456

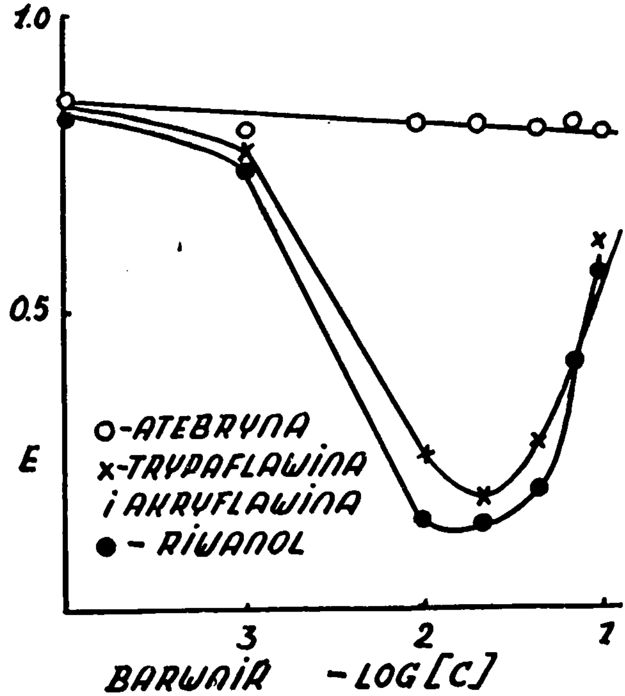
Tabl. Nr II. Ilościowy bilans frakcji wytrącających się i niewytrącających się 0,01 M roztworem barwnika.

2. 3. 6. *Wpływ NaCl na wytrącanie białek surowicy barwnikami akrydynowymi.*

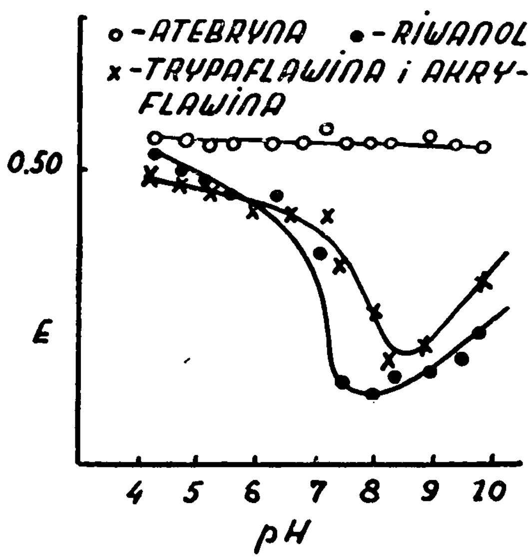
W serii doświadczeń przebadano wytrącanie białek surowicy riwanolem, trypaflawiną i akryflawiną w obecności różnych stężeń NaCl. Roztwór barwnika sporządzono w odpowiednim roztworze NaCl i dodawano do surowicy w stosunku 5:1. Reakcję biure-



Ryc. 9. Wytrącanie białek surowicy przy pomocy akryflawiny przy stałym pH = 8,0. Technika paskowa.



Ryc. 10. Wytrącanie białek surowicy przy pH = 8,2.



Ryc. 11. Wytrącanie białek 0,01 M roztworem barwnika.

tową i badanie elektroforetyczne przeprowadzono w zwykły sposób. Wykazano, że działanie wytrącające barwników akrydynowych zmniejsza się ze wzrostem NaCl w środowisku. Badanie elektroforetyczne wykazało, że w miarę wzrostu stężenia NaCl pojawiają się stopniowo w przesączu frakcje: albuminowa i α-globulinowa. Przy większych stężeniach NaCl obraz elektroforetyczny jest zniekształcony.

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika także, że wpływ NaCl na działanie trypaflawiny i akryflawiny jest silniejszy niż na działanie riwanolu (Ryc. 15, 16, 17). (Tabl. III).



Ryc. 12. Wytrącanie białek surowicy riwanolem przy zmiennym pH. Stężenie riwanolu 0,01 M.

Tabela III

Końcowe stężenie NaCl w M	Siła jonowa μ	Kontrola bez barw	Riwanol		Akryflawina		Trypaflawina		
		% wytrąc. białka	E	% wytrąc. białka	E	% wytrąc. białka	E	% wytrąc. białka	Kontrola E
2.5	2.5	0	0.460	3.14	0.480	1.0	0.480	1.0	0.475
1.0	1.0	0	0.450	5.3	0.470	1.0	0.480	1.0	0.475
0.5	0.5	0	0.420	11.5	0.465	2.1	0.460	3.15	0.475
0.1	0.1	0	0.170	64.2	0.440	7.4	0.440	7.4	0.475
0.01	0.01	0	0.070	85.3	0.140	70.6	0.140	70.6	0.475
0.001	0.001	0	0.070	85.3	0.100	79.0	0.100	79.0	0.475

Tabl. Nr III. Wpływ NaCl na wytrącanie białek surowicy pochodnymi akrydyny. Stęż. barw. 0,01 M, pH = 7,8.

2. 3. 7. *Wpływ innych soli nieorganicznych na wytrącanie białek surowicy barwnikami akrydynowymi.*

Doświadczenia przeprowadzono tak samo, jak przy badaniu wpływu NaCl. Użyto następujących soli nieorganicznych: KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$ i $FeCl_3$. Stwierdzono, że przy użyciu równomolarnych roztworów sole zawierające dwuwartościowe kationy zapobiegają w większym stopniu wytrącaniu białek surowicy przez barwniki akrydynowe niż sole zawierające jednowartościowe kationy. Trójwartościowy jon żelazowy zachowuje się jeszcze nieco inaczej. Użyty w większych stężeniach działa wytrącająco na białka surowicy już bez barwnika, a w stężeniach mniejszych, w których białek surowicy nie wytrąca, również zapobiega wytrącaniu białek surowicy przez barwniki akrydynowe i to w większym stopniu aniżeli sole składające się z dwuwartościowego kationu. Należy tutaj uwzględnić jeszcze wpływ hydrol'zy $FeCl_3$.

Różnica w zachowaniu się soli zawierających równowartościowe kationy wobec działania barwników akrydynowych na białka surowicy nie jest tak duża jeżeli bierze się pod uwagę siłę jonową roztworu danej soli. Wpływ użytych soli jest silniejszy na działanie trypaflawiny i akryflawiny aniżeli na działanie riwanolu. (Tabl. IV, V, VI, VII).

Tabele IV, V i VI.

Stężenie KCl w M	Siła jonowa μ	Kontr. bez barw.	Riwanol	Akryflawina	Trypaflawina
		% wytrąconego białka			
0.5	1.5	0	11.1	2.0	2.1
0.25	0.75	0	19.0	3.1	3.6
0.1	0.3	0	62.0	7.4	7.3
0.01	0.03	0	82.5	73..2	73.8

Tabl. Nr IV. Wpływ chlorku potasowego na wytrącanie białek surowicy barwnikami akrydynowymi. Stęż. barw. 0,01 M, pH = 8,0.

Stężenie $CaCl_2$ w M	Siła jonowa μ	Kontr. bez barw.	Riwanol	Akryflawina	Trypaflawina
		% wytrąconego białka			
0.5	1.5	0	0	0	0
0.25	0.75	0	5.1	0	0
0.1	0.3	0	10.2	1.8	1.8
0.01	0.03	0	74.2	5.3	9.1

Tabl. Nr V. Wpływ chlorku wapniowego na wytrącanie białek surowicy barwnikami akrydynowymi. Stęż. barw. 0,01 M, pH = 7,8—8,0.

Stężenie $MgCl_2$ w M	Siła jonowa μ	Kontr. bez barw.	Riwanol	Akryflawina	Trypaflawina
		% wytrąconego białka			
0.5	1.5	0	0	0	0
0.25	0.75	0	6.2	6.2	1.8
0.1	0.3	0	11.3	7.8	16.3
0.01	0.03	0	75.3	51.9	53.0

Tabl. Nr VI. Wpływ chlorku magnezowego na wytrącanie białek surowicy barwnikami akrydynowymi. Stęż. barw. 0,01 M, pH = 7,8—8,0.

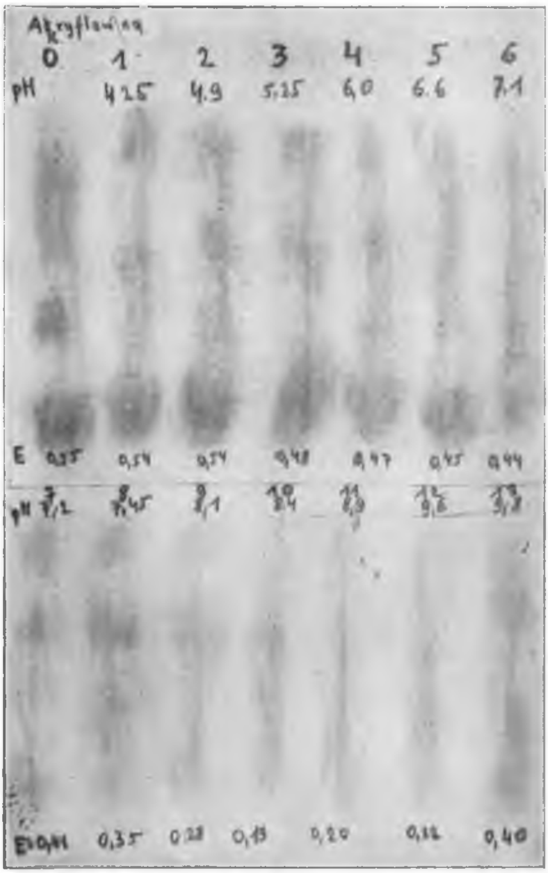
2. 3. 8. *Rozpuszczanie wytrąconego przez barwniki akrydynowe białka w roztworach różnych soli.*

Przykładem będzie doświadczenie, w którym badano szybkość rozpuszczania się wytrąconego riwanolem białka surowicy w roztworach soli zawierających jedno, dwu i trójwartościowe kationy.

Tabela VII.

Stężenie $FeCl_3$ w M	Siła jonowa μ	Kontr. bez barw.	Riwanol	Akryflawina	Trypaflawina
		% wytrąconego białka			
0.5	3.0	71.4	71.6	74.0	74.0
0.25	1.5	51.2	44.0	50.0	51.5
0.1	0.6	4.7	3.8	4.5	4.3
0.01	0.06	3.2	8.4	2.2	9.2

Tabl. Nr VII. Wpływ chlorku żelazowego na wytrącanie białek surowicy barwnikami akrydynowymi. Stęż. barw. 0,01 M, pH = 7,8—8,0.



Ryc. 13. Wytrącanie białek surowicy akryflawiną przy zmiennym pH. Stężenie akryflawiny 0,01 M.

Wytrącone 0,01 M roztworem riwanolu białko, odwirowano, płyn znad osadu zlano, osad dwukrotnie przemywano wodą destylowaną celem usunięcia nadmiaru barwnika i następnie rozpuszczano w określonej objętości 0,1 M roztworze danej soli. Po 4, 24 i 36 godz. pobierano próbki roztworu i oznaczano w nich zawartość białka metodą biuretową. Za miarę szybkości rozpuszczania się osadu przyjęto przyrost ekstynkcji na 1 godz.

Największy przyrost ekstynkcji stwierdzono przy rozpuszczaniu wytrąconego białka w roztworze HCl i $FeCl_3$, mniejszy w roztworach $CaCl_2$, najmniejszy w roztworach KCl. (Ryc. 18). (Tabl. VIII).



Ryc. 14. Wytrącanie białek surowicy atebryną przy zmiennym pH. Stężenie atebryny 0,01 M.

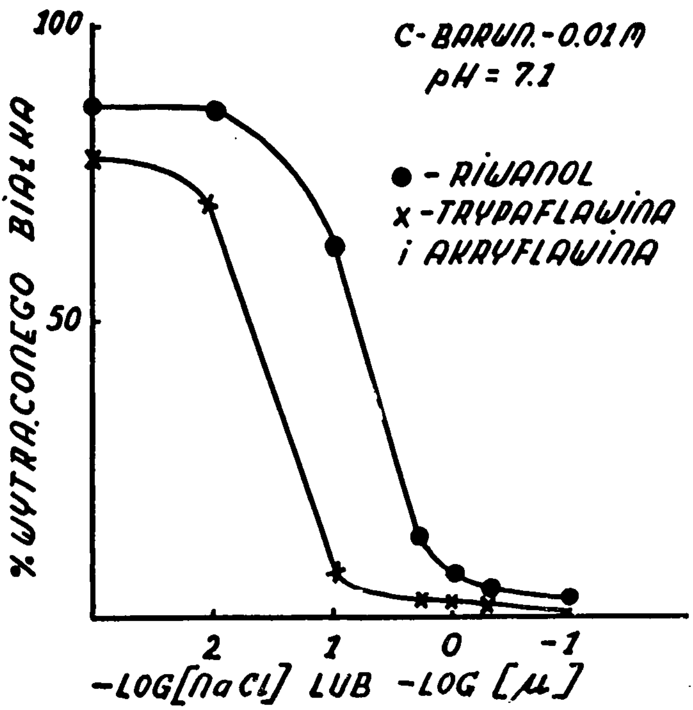
Tabela VIII.

Rodzaj elektrolitu	Siła jonowa roztworu μ	Ekstynkcja			Szybkość rozpuszcz. $\frac{\Delta E}{t}$
		po 4 godz.	po 24 godz.	po 36 godz.	
KCl	0.1	0.000	0.018	0.030	0.0012
$CaCl_2$	0.3	0.012	0.072	0.110	0.0030
$FeCl_3$	0.6	0.040	0.231	0.320	0.009
HCl	0.1	0.038	0.260	0.355	0.010

Tabl. Nr VIII. Rozpuszczanie wytrąconego przez barwniki akrydynowe białka w roztworach różnych elektrolitów. Stęż. elektrolitu 0,1 M.

2. 3. 9. *Rozpuszczanie wytrąconego przez barwniki akrydynowe białka surowicy w roztworach soli o jednakowym kationie.*

Wytrącone przy pomocy riwanolu białko po odwirowaniu i dwukrotnym przemyciu w wodzie destylowanej rozpuszczono



Ryc. 15. Wpływ siły jonowej na wytrącanie białek surowicy

w roztworach KCl i KH_2PO_4. Stwierdzono, że szybkość rozpuszczania zależy od stężenia roztworu, ale jest niezależna od tego czy rozpuszczanie zachodzi w roztworze KCl czy KH_2PO_4. (Ryc. 19). (Tabl. IX).

Tabela IX.

Stężenie KCl w M	Ekstynkcja			$\frac{\Delta E}{t}$
	po 4 godz.	po 24 godz.	po 36 godz.	
2.0	0.040	0.210	0.350	0.010
1.0	0.027	0.155	0.251	0.0062
0.5	0.022	0.130	0.200	0.0055
0.1	0.0	0.118	0.010	0.0012
Stężenie KH_2PO_4 w M	po 4 godz.	po 24 godz.	po 36 godz.	$\frac{\Delta E}{t}$
1.0	0.27	0.160	0.260	0.0064
0.5	0.20	0.110	0.185	0.0046
0.1	0.0	0.025	0.040	0.0012

Tabl. Nr IX. Rozpuszczanie wytrąconego riwanolem białka surowicy w roztworach soli o jednakowym kationie, pH = 7,1—7,2.

2. 3. 10. *Badanie szybkości dyfuzji barwników akrydynowych w obecności surowicy do środowiska wodnego i do roztworu NaCl.*

Doświadczenie przeprowadzono z trypaflawiną. Do woreczków celofanowych ,oznaczonych literami A, B, C i D dodano:

do A: 4 ml surowicy i 20 ml 0,01 M roztworu trypaflawiny w wodzie.

do B: 4 ml surowicy i 20 ml 0,01 M roztworu trypaflawiny w 0,25 M roztworze NaCl.

Dializowano wobec wody destylowanej.

Do C: 4 ml surowicy i 20 ml 0,01 M roztworu trypaflawiny w wodzie.

Do D: 4 ml surowicy i 20 ml 0,01 M roztworu trypaflawiny w 0,25 roztworze NaCl.

Dializowano wobec 0,25 M roztw. NaCl.

Co pewien czas pobierano z naczyń, w których przebiegała dializa 5 ml płynu i oznaczano ekstynkcję na fotometrze Pulfricha przy użyciu filtru S — 50. Przyrost ekstynkcji płynu stanowił miarę szybkości dyfuzji barwnika z woreczka celofanowego do otaczającego płynu. Największą szybkość dyfuzji zaobserwowano w zestawie B i C. W zestawach A i D szybkość dyfuzji była prawie jed-



Ryc. 16. Wpływ siły jonowej na wytrącanie białek surowicy riwanolem. Stężenie riwanolu 0,01 M. pH = 7,8.

nakowa. Zauważono też, że powstały w woreczku C osad rozpuścił się. W woreczku B początkowo nie zauważono powstawania osadu. Po kilku godzinach powstał jednak wyraźny osad. W woreczku A ilość powstałego w czasie dializy osadu znacznie się zmniejszyła. W woreczku D przez cały czas dało się zauważyć lekkie zmętnienie zawartości woreczka. (Tabl. X).

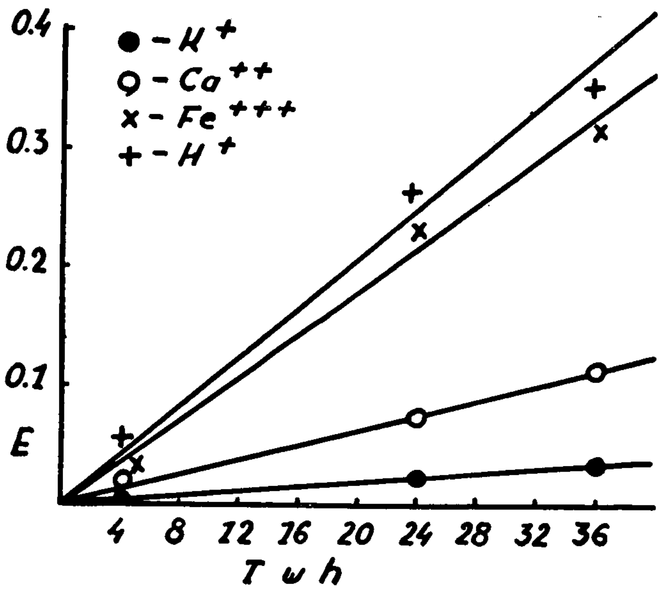


Ryc. 17. Wpływ siły jonowej na wytrącanie białek surowicy akryflawiną i trypaflawiną. Stężenie barw. 0,01 M. pH = 7,8.

Tabela X.

Czas	Układy			
	A	B	C	D
0	0.000	0.000	0.000	0.000
15 '	0.040	0.045	0.045	0.035
60 '	0.070	0.085	0.130	0.070
2 h	0.120	0.170	0.190	0.120
4 h	0.180	0.230	0.250	0.165
7 h	0.270	0.270	0.290	0.270
20 h	0.290	0.300	0.350	0.290

Tabl. Nr X. Szybkość dyfuzji trypaflawiny w obecności surowicy do środowiska wodnego i do roztworu NaCl.



Ryc. 18. Wypieranie riwanolu przez kationy.

2. 3. 11. *Porównanie szybkości dyfuzji barwników akrydynowych wchodzących w skład niewytrącającej się frakcji białek surowicy i barwników akrydynowych rozpuszczonych w wodzie.*

Doświadczenia przeprowadzono z riwanolem. Do 3 ml surowicy dano 10 ml 0,3% riwanolu. Zawartość probówki przesączono i 5 ml przesączu nalano do woreczka celofanowego (A). Równocześnie zmierzono ekstynkcję przesączu przy dług. fali 500 m μ. Do woreczka B nalano 5 ml wodnego roztworu riwanolu wykazującego tę samą ekstynkcję co i przesącz. Dializowano wobec wody destylowanej. Szybkość dyfuzji riwanolu rozpuszczonego w wodzie jest znacznie większa niż riwanolu obecnego w przesączu. (Tabl. XI).

Tabela XI.

Czas	Układy	
	A	B
0	0.000	0.000
15 '	0.040	0.060
60 '	0.060	0.110
2 h	0.140	0.220
4 h	0.160	0.275
7 h	0.180	0.280
20 h	0.200	0.290

Tabl. Nr XI. Szybkość dyfuzji riwanolu wchodzącego w skład niewytrącającej się frakcji białek surowicy i riwanolu rozpuszczonego w wodzie.

2. 3. 12. *Badanie szybkości dyfuzji trypaflawiny w obecności albumin.*

Sporządzono roztwór albumin zawierający 35 mg suchego preparatu w 1 ml. Roztwór ten zmieszano z 0,01 M roztworem trypaflawiny w stosunku 1:5 (pH próbki = 8,0). Nie zauważono powstawania osadu. Zawartość probówki dano do woreczka celofanowego i dializowano wobec wody (A) i wobec 0,25 M roztworu NaCl. (C). Kontrolę stanowił roztwór samej trypaflawiny rozcieńczony wodą w stosunku 5:1 ,który dializowano również wobec NaCl (D) i wody (B). Szybkość dyfuzji mierzono jak w doświadczeniu 2.3.10. Okazało się, że trypaflawina rozpuszczona w wodzie dyfunduje szybciej na zewnątrz, aniżeli trypaflawina zmieszana z albuminą surowiczą. (Tabl. XII).

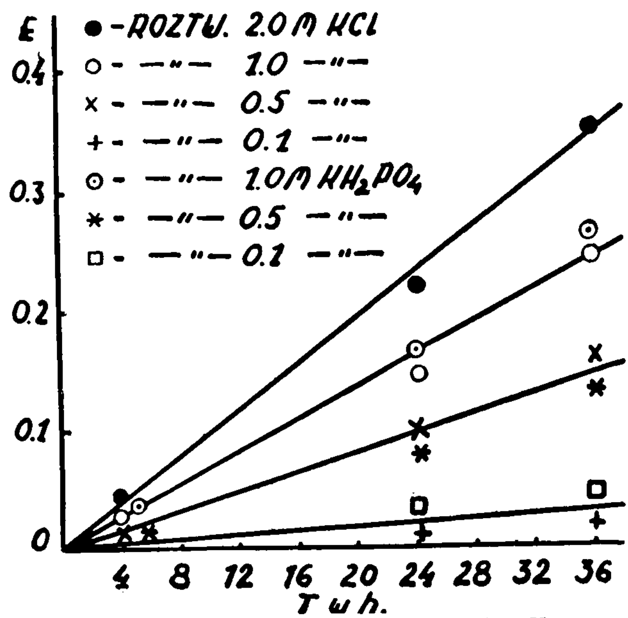
Tabela XII.

Czas	Układy			
	A	B	C	D
0	0	0	0	0
30′	0.110	0.115	0.120	0.090
2 h	0.390	0.420	0.295	0.340
3 h	0.460	0.500	0.345	0.365
4 h	0.480	0.560	0.400	0.440
7 h	0.500	0.590	0.480	0.470

Tabl. Nr XII. Szybkość dyfuzji trypaflawiny w obecności albumin.

2. 3. 13. *Konduktometryczne miareczkowanie roztworu albumin riwanolem.*

Sporządzono roztwór albumin zawierający 35 mg suchego preparatu w 1 ml. 10 ml tego roztworu dano do naczyńka elektrolitycznego i zmierzono jego opór. Następnie dodawano małe porcje 0,01 M roztworu riwanolu i po dodaniu każdej porcji mierzono



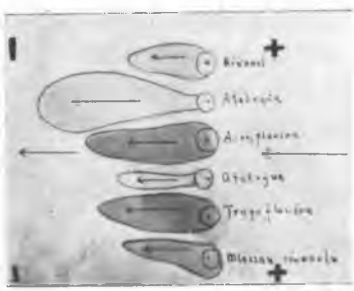
Ryc. 19. Wypieranie riwanolu przez jon K+.

opór roztworu. W celach porównawczych przeprowadzono analogiczne doświadczenie z wodą i roztworem NaCl wykazującym ten sam opór, co użyty roztwór albumin. Przebieg miareczkowania albumin był identyczny z przebiegiem miareczkowania roztworu NaCl. (Tabl. XIII).

Tabela XIII.

Ilość dodanego 0.01 M. roztworu riwanolu lub wody (x)	Roztwór albumin	Roztwór NaCl	Woda	Roztwór albumin
	Opór w ohmach			
0	700	750	41.000	700 (x)
0.5	700	700	12.000	700 (x)
1.0	700	700	6.500	700 (x)
2.0	700	700	3.650	700 (x)
3.0	700	700	2.700	800 (x)
4.0	720	700	2.200	870 (x)
5.0	750	700	1.900	950 (x)
8.0	800	700	1.450	1100 (x)
10.0	800	700	1.250	1200 (x)

Tabl. Nr XIII. Konduktometryczne miareczkowanie roztworu albumin riwanolem.



Ryc. 20. Wędrowanie barwników akrydynowych w polu elektrycznym. 113 V, 4 MA, H = 16, pH = 8,6. Bufor wg Holta.

2. 3. 14. *Konduktometryczne miareczkowanie roztworu riwanolu albuminami.*

0,005 roztwór riwanolu miareczkowano roztworem albumin zawierających 17 mg suchego preparatu w 1 ml. Analogiczne miareczkowanie przeprowadzono z roztworem NaCl wykazującym opór 1500 Ohm. W obu roztworach miareczkowanie miało identyczny przebieg. (Tabl. XIV).

Tabela XIV.

Ilość dodanego roztworu albumin	Riwanol	NaCl
	Opór w ohmach	
0	1.550	1.500
1.0	1.450	1.450
3.0	1.400	1.350
8.0	1.350	1.300

Tabl. Nr XIV. Konduktometryczne miareczkowanie roztworu riwanolu albuminami.

2. 3. 15. *Badanie niektórych własności fizycznych barwników akrydynowych.*

a) Badanie względnej szybkości wędrówki barwników akrydynowych w polu elektrycznym.

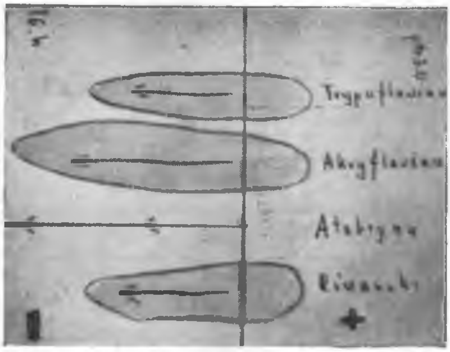
0,01 M roztworu riwanolu, atebryny, akryflawiny i trypaflawiny nakroplono na szeroki pasek bibuły Whatman Nr 4, nasiąknięty buforem medinalowym sporządzonym wg Holta, o pH 3,0, albo 12,0. Pasek umieszczono w kamerze elektroforetycznej i przepuszczono przez niego prąd stały o napięciu 113 V i natężeniu 4 MA w ciągu 16 godzin. Wykazano, że wszystkie użyte przez nas barwniki akrydynowe wędrują w kierunku katody z różną szybkością. Kolejność wędrowania jest następująca:

Atebryna > Akryflawina = Trypaflawina > Riwanol

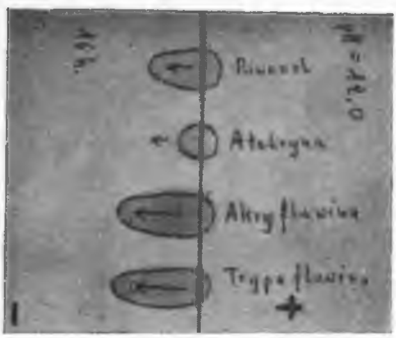
Zakwaszenie buforu przyśpiesza wędrówkę barwnika a zalkalizowanie zwalnia. (Ryc. 20, 21, 22).

b) Badanie przewodnictwa roztworów riwanolu, akryflawiny, trypaflawiny i atebryny.

Oznaczenie konduktometryczne przeprowadzono na konduktometrze wg K o h l r a u s c h a w naczyniu elektrolitycznym z platynowymi elektrodami. Wykazano, że największe przewodnictwo właściwe, a najmniejszy opór właściwy wykazują roztwory ate-



Ryc. 21. Wędrowanie barwników akrydynowych w polu elektrycznym. 113 V, 4 MA, H = 16, pH = 3,0. Bufor wg H o l t a.



Ryc. 22. Wędrowanie barwników akrydynowych w polu elektrycznym. 113 V, 4 MA, H = 16, pH = 12,0. Bufor wg H o l t a.

bryny. Najmniejsze przewodnictwo a największy opór właściwy wykazują natomiast roztwory riwanolu. Rozcieńczenie roztworu barwnika powoduje odpowiedni wzrost oporu stawianego przez roztwór. (Tabl. XV).

Tabela XV.

Barwnik	Riwanol			Trypaflawina		
Próbki	1	2	3	1	2	3
Stężenie w M	0.01	0.005	0.001	0.01	0.005	0.001
χ przy 25 C $\Omega^{-1}cm^{-1}$	0.00042	0.00022	0.000044	0.00096	0.00045	0.000093
ρ przy 25 C w $\Omega \cdot cm$	2389	4545	22727	1042	2222	10725
Barwnik	Akryflawina			Atebryna		
Próbki	1	2	3	1	2	3
Stężenie w M	0.01	0.005	0.001	0.01	0.005	0.001
χ przy 25 C $\Omega^{-1}cm^{-1}$	0.00096	0.00042	0.00092	0.00126	0.00066	0.00015
ρ przy 25 C w Ω cm	1042	2381	10969	793	1515	6666

Tabl. Nr XV. Badanie przewodnictwa roztworów barwników akrydynowych.

2. 3. 16. *Wpływ globulinowego preparatu II—R/2 na przebieg wytrącania albumin barwnikami akrydynowymi.*

a. Otrzymywanie preparatu II-R/2.

Do surowicy ludzkiej dodano 0,3% roztworu riwanolu w stosunku 1:5. Powstały osad usuwano przesączając przez gęsty sączek z dodaniem Supper-Cellu. Następnie przesącz zakwaszono do pH = 6,4 odpowiadającemu pustkowi izoelektrycznemu dla γ-globulin i przepuszczano przez kolumnę węgla aktywowanego.

Płyn po przejściu przez węgiel aktywowany jest zupełnie klarowny i całkowicie uwolniony od barwnika. Zawartość białka jest niewielka i nie przekracza 1%. Oczyszczony w ten sposób płyn daje się do naczyń obj. ok. 500 ml i odparowuje pod próżnią w niskiej temperaturze. Otrzymany biały proszek słabo rozpuszcza się w wodzie, jest natomiast dobrze rozpuszczalny w fizjologicznym roztworze NaCl i daje skłaczkowanie z zawiesiną kefalino-cholesterolową. Badaniem elektroforetycznym wyliczono procentowy skład białkowy otrzymanego preparatu. (II-R/2):

β-globulin 33,3%

γ-globulin 66,7%.

Roztwór frakcji II-R/2 zadany 0,3% riwanolem w stosunku 1:5 częściowo się wytrąca. (Ryc. 23).

b. *Wpływ preparatu II-R/2 na przebieg wytrącania albumin riwanolem.*

Sporządzono roztwór albuminy surowiczej w fizjologicznym roztworze NaCl zawierającym 35 mg sproszkowanej albuminy w 1 ml, analogiczny roztwór preparatu II-R/2, oraz roztwór zawierający w 1 ml 35 mg albumin i 35 mg preparatu II-R/2. Roztwory te zadawano 0,3% riwanolem w stosunku 1:5. Powstały osad odsączono, a w przesączu oznaczono zawartość białek metodą biuretową. W doświadczeniu tym udało się wykazać, że mieszanina albumin i preparatu globulinowego II-R/2 jest bardziej podatna na wytrącające działanie riwanolu aniżeli jej składniki występujące osobno. Badaniem elektroforetycznym stwierdzono, że występujące w mieszaninie albuminy wytrącają się riwanolem ,a więc zachowują się inaczej w porównaniu z albuminami występującymi osobno w roztworze. (Tabl. XVI).

Tabela XVI.

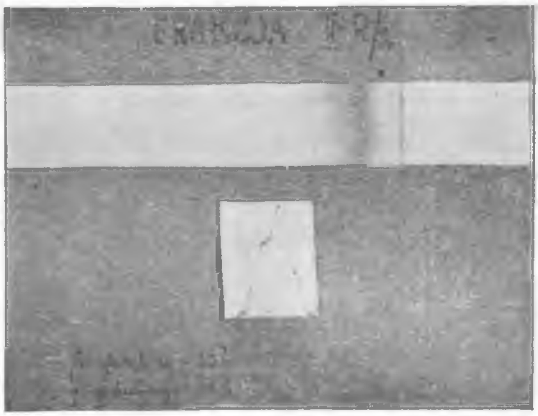
Roztwór	Ekstynkcja przed wytrąceniem E_1	Ekstynkcja po wytrąceniu E_2	$E_1 - E_2$
Albumina	0.220	0.210	0.010
Prep.II-R/2	0.080	0.060	0.020
Alb +II-R/2	0.300	0.100	0.200

Tabl. Nr XVI. Wpływ preparatu II-R/2 na przebieg wytrącania albumin riwanolem.

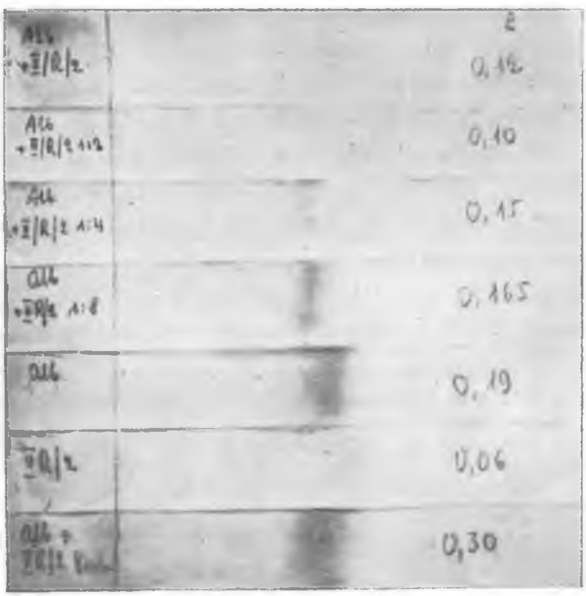
c. *Wpływ preparatu II-R/2 na przebieg wytrącania albumin równoważnymi roztworami riwanolu, akryflawiny i trypaflawiny.*

Użyto roztworu albuminy zawierającego 70 mg sproszkowanej albuminy w 1 ml i roztworu preparatu II-R/2 zawierającego w 1 ml 78 mg rozpuszczonej substancji. Preparaty białkowe rozpuszczono w fizjologicznym roztworze NaCl. Wytrącanie przeprowadzono 0,01 M roztworami barwników przy pH = 7,9. Do wytrącania brano: 0,5 ml roztworu albuminy i 0,5 ml roztworu preparatu II-R/2 rozcieńczonego w stosunku 1:2, 1:4, 1:8.

Barwniki akrydynowe dodawano w zwykłych proporcjach ilościowych. W przesączu określano ilość białek przy pomocy reakcji biuretowej. Przeprowadzono również elektroforetyczną kontrolę wyników. Wykazano, że ilość preparatu II-R/2 ma wyraźny wpływ na wytrącanie albumin barwnikami akrydynowymi. Na proteino-



Ryc. 23. Frakcja II-R/2.



Ryc. 24. Wpływ globulin (F. II-R) na proces wytrącania albumin riwanolem. pH = 8,0.

gramach jest widoczne, że przy zmniejszającym się stężeniu preparatu II-R/2 w środowisku, coraz większa ilość albumin pozostaje w roztworze. (Ryc. 24). (Tabl. XVII).

Tabela XVII.

Roztwór	Kontrola bez barwnika	Riwanol		Akryflawina		Trypaflawina	
	E	E	% wytrąc. białka	E	% wytrąc. białka	E	% wytrąc. białka
Alb: + fizj.	0.200	0.200	0.0	0.195	2.5	0.195	2.5
II-R/2+fizj.	0.085	0.080	3.8	0.070	17.6	0.065	23.5
Alb+II-R/2	0.305	0.120	60.6	0.120	60.6	0.120	60.6
Alb+II-R/2, 1:2	0.265	0.100	62.2	0.100	62.2	0.100	62.2
Alb+II-R/2, 1:4	0.240	0.150	37.5	0.150	37.5	0.150	37.5
Alb+II-R/2, 1:8	0.230	0.165	28.2	0.170	26.1	0.165	28.2

Tabl. Nr XVII. Wpływ preparatu II-R/2 na przebieg wytrącania albumin równocząsteczkowymi roztworami barwników akrydynowych.

2. 3. 17. *Określanie normalnej zawartości tzw. frakcji II-R w surowicy ludzkiej.*

Frakcję II-R oznaczano w sposób następujący: 0,5 ml surowicy zadawano 2,5 ml 0,3% roztworu riwanolu i sączono przez gęsty sączek lub wirowano na szybkich obrotach. 2,0 ml przesączu przenoszono do probówki wirowniczej, rozcieńczano do obj. 5 ml wodą i znajdujące się w przesączu białka wytrącano 5 ml 10% kwasu trójchlorooctowego. Po odwirowaniu osad rozpuszczano w 1 ml 30% NaOH. Następnie dodawano 1 ml 5% $CuSO_4$ i uzupełniano wodą. do obj. 10 ml.

Po wytrząśnięciu zawartości probówki jeszcze raz wirowano i oznaczano ekstynkcję przesączu. Zawartość białka w % wyliczono z krzywej kalibracyjnej.

Frakcję II-R białka oznaczono u 146 zdrowych osób.

		Białka całkowite	Frakcja II-R
Śr. arytm.	—	7,79 g%	1,79 g%
Odch. stand.	—	0,245 g%	0,146 g%
Współcz. zmien.	—	3,1%	8,04%
Błąd standart.	—	0,0205 g%	0,0122 g%

Współczynnik korelacji (r) między poziomem białek surowicy a poziomem frakcji II-R wynosi:

$$r = \frac{\Sigma \chi y}{N \sigma \chi \sigma y} = 0,66$$

gdzie χ, y — odchylenie od średniej. $\sigma, \chi\ \sigma y$ — odchylenie standardowe. N — liczba oznaczeń.

2. 3. 18. *Wpływ barwników akrydynowych na niektóre enzymy.*

a. **Diastaza.**

Roztwór diastazy użyty do badań zawierał 10 mg preparatu enzymatycznego w 1 ml. Enzym rozpuszczono w fizjologicznym roztworze NaCl. Oznaczenia przeprowadzano przy pH ok. 7,0. Aktywność roztworu enzymu wynosiła 1024 j Wohlgemutha. Barwniki akrydynowe dodawano w ten sposób, że tą samą ilość diastazy, co w kontroli, rozpuszczono w 0,01 M roztworze barwnika. Preparat enzymatyczny rozpuszczał się w roztworze barwnika całkowicie. We wszystkich oznaczeniach substratem była skrobia. Stwierdzono, że żaden z użytych barwników (riwanol, akryflawina, trypaflawina, atebryna) nie wywierał wpływu na aktywność diastazy.

b. **Trypsyna.**

3 mg krystalicznej trypsyny rozpuszczono w 1 ml 0,05 M buforu fosforanowego. Substratem dla enzymu była kazeina rozpuszczona w 0,2 n NaOH. pH roztworu kazeiny wynosiło 8,2. Aktywność proteolityczną enzymu mierzono oznaczając różnice ekstynkcji przesączów otrzymanych po zadaniu roztworu enzym-substrat kwasem trójchlorooctowym przed i po inkubacji i wykonaniu na nich reakcji biuretowej. Im większa różnica ekstynkcji tym większa aktywność proteolityczna enzymu. Próbki enzymu zadawano barwnikami akrydynowymi (atebryną, akryflawiną, trypaflawiną i riwanolem) w ten sposób, aby końcowe stężenie barwnika wynosiło od 0,01 M do 0,0001 M. Zauważono, że aktywność enzymu w całym zakresie użytych stężeń jest o 50% niższa niezależnie od stężenia barwnika w danej próbce. Wyjątek stanowi atebryna, w obecności której enzym wykazuje normalną aktywność. Stwierdzono także, że po zadaniu roztworu trypsyny barwnikami akrydynowymi nie powstaje osad. Osad powstaje natomiast po zadaniu barwnikami roztworu kazeiny. Atebryna nie powoduje powstania osadu po zmieszaniu jej z roztworem kazeiny.

c. **Ureaza.**

Do preparatu ureazy zawierającego 10 mg enzymu w 1 ml 30% alkoholu etylowego, dodawano barwniki akrydynowe w stężeniach od 1 M — 0,001 M w stosunku 1:3 do całkowitej objętości roztworu.

Substratem był mocznik. pH przy jakim badano aktywność ureazy wynosiła ok. 7,2. Miarą aktywności enzymu była ilość powstałego w czasie inkubacji amoniaku, który wypierano przy pomocy NaOH z roztworu. Wyparty amoniak dyfundował w naczyńku mikrodyfuzyjnym do kwasu siarkowego i jako siarczan amonowy był oznaczany ilościowo odczynnikiem Nesslera. Stwierdzono, że barwniki akrydynowe hamują aktywność ureazy. Najsilniej hamują akryflawina i trypaflawina a nieco słabiej riwanol. Najsłabiej hamuje atebryna. Żaden z użytych barwników nie reaguje w widoczny sposób z mocznikiem. (Tabl. XVIII).

Tabela XVIII

Stężenie barwnika w M	Riwanol	Akryflawina	Trypaflawina	Atebryna
	% aktywności enzymu			
0	100	100	100	100
0.0001	96.4	69.5	90.7	100
0.0005	86.9	58.6	70.9	78.4
0.01	64.2	38.0	61.6	72.9
0.05	45.0	27.1	39.9	64.8
0.1	44.0	30.6	35.0	79.7
1.0	40.0	21.7	30.2	81.0

Tabl. Nr XVIII. Wpływ barwników akrydynowych na ureazę.

Do mieszaniny mocznik — ureaza — barwnik akrydynowy dodawano NaCl w różnych stężeniach. Stwierdzono, że NaCl częściowo neutralizuje hamujące działanie barwników akrydynowych. Działanie NaCl jest szczególnie wyraźne wobec riwanolu. Działanie NaCl jest proporcjonalne do jego stężenia w mieszaninie. (Tabl. XIX).

Tabela XIX

Stężenie NaCl w M	Stężenie barwnika 0.1 M		
	Riwanol	Akryflawina	Trypaflawina
	% aktywności enzymu		
Kontrola bez barwnika	100	100	100
0.3	66.0	40.7	41.6
0.6	71.7	46.5	66.7
1.5	71.7	46.5	65.2
3.0	94.3	46.5	66.7

Tabl. Nr XIX. Wpływ NaCl na aktywność barwników akrydynowych wobec ureazy.

d. Dehydrogenaza kwasu bursztynowego (SD).

Do badań użyto preparatu dehydrogenazy kwasu bursztynowego, otrzymanego wg Balla (15). Preparat ten oprócz dehydrogenazy kwasu bursztynowego zawiera jeszcze oksydazę cytochromową i cytochrom-b. W stosowanej przez nas metodyce oznaczania aktywności dehydrogenazy kwasu bursztynowego oksydaza cytochromowa i cytochrom-b zostają unieczynnione przez dodanie do środowiska cjanku. Substrat dla SD stanowił bursztynian sodowy. Oznaczenia przeprowadzono zawieszając preparat enzymatyczny w 0,01 M buforze fosforanowym o pH 7,4. Miarą aktywności SD jest szybkość odbarwiania się roztworu dwuchlorofenoluindofenolu, wyrażona zmianą ekstynkcji na 1 minutę. Czas pomiaru wynosi 3 minuty. Barwniki akrydynowe dodawano w takich ilościach, że końcowe ich stężenie wynosiło od 0,01 M do 0,00001 M. Preparat SD wg Balla (15), po zadaniu go bardziej stężonym roztworem barwnika wypadał w postaci osadu, który jednak w dalszym ciągu częściowo zachowywał swoją aktywność enzymatyczną. Dodanie atebryny nie wywołało powstawania osadu. Przy użyciu małych stężeń riwanolu, akryflawiny i trypaflawiny zaobserwowano zjawisko aktywacji preparatu SD. Szybkość odbarwiania się roztworu dwuchlorofenolu-indofenolu była wtedy znacznie większa niż w kontroli. Przy użyciu 0,00001 M roztworów aktywność preparatu wobec kontroli wynosiła 140% po dodaniu riwanolu, 133% po dodaniu trypaflawiny, a 123,4% po dodaniu akryflawiny.

Akryflawina i trypaflawina aktywowały preparat SD jeszcze przy stężeniach 0,0001 M, a ślady aktywacji przez trypaflawinę można było jeszcze dostrzec przy końcowym stężeniu barwnika 0,001 M. Atebryna nie aktywowała preparatu. Przy użyciu większych stężeń barwnika następuje częściowe zahamowanie aktywności dehydrogenazy kwasu bursztynowego. Nie udało się jednak doprowadzić do całkowitego zahamowania SD. Okazało się, że wytrącony przez 0,1 M roztwór barwnika enzym po przepłukaniu wodą i zawieszeniu w buforze fosforanowym jest jeszcze nadal częściowo aktywny. (Tabl. XX).

Tabela XX

Stężenie barwnika w M	Riwanol		Trypaflawina		Akryflawina		Atebryna	
	Akt.	% Akt.	Akt.	% Akt.	Akt.	% Akt.	Akt.	% Akt.
Kontrola	0.080	100	0.072	100	0.094	100	0.096	100
0.00001	0.112	140	0.096	133	0.116	123	0.082	85
0.0001	0.074	93	0.086	119	0.100	106	0.068	71
0.0005	0.060	75	0.076	106	0.066	70	0.054	56
0.001	0.056	56	0.072	100	0.048	51	0.054	56
0.005	0.052	65	0.056	78	0.030	32	0.048	40
0.01	0.052	65	0.046	64	0.028	30	0.032	33

Tabl. Nr XX. Wpływ barwników akrydynowych na aktywność dehydrogenazy kwasu bursztynowego (SD).

Dodanie do środowiska NaCl powoduje znacznego stopnia zahamowanie aktywności SD. Mniejsze stężenia NaCl, które same tylko nieznacznie obniżają aktywność preparatu SD nie wywierają żadnego wpływu na przebieg hamowania dehydrogenazy kwasu bursztynowego przez barwniki akrydynowe.

3. Omówienie wyników i wnioski

W piśmiennictwie spotyka się bardzo niewiele prac, zajmujących się wpływem barwników akrydynowych na białka. W roku 1950 Gorodskaja (1) opierając się na wcześniejszych badaniach Smirnowej i Ryżkowa (2), zastosowała riwanol do oczyszczania wirusa choroby mozaikowej tytoniu. Z surowego ekstraktu liści tytoniu wytrącała wirusa 0,2% riwanolem, który usuwała następnie kilkudniową dializą wobec bieżącej wody.

Hořejši (3) tę samą metodę zastosował do rozdzielania białek surowicy 0,3% riwanolem dodanym do surowicy w stos. 5:1, wytrącał część białek surowicy, a z przesączu usuwał riwanol przy pomocy aktywowanego węgla. Otrzymany przez niego preparat białkowy składał się w 95,3% z γ-globulin, a w 4,7% z β-globulin. Wypreparowane przez Hořejši (3) γ-globuliny zachowywały związane z nimi przeciwciała i zostały zastosowane w leczeniu żółtaczki zakaźnej (30). (Pečenka, Raška). Irwin i Irwin (31), zajmowali się współdziałaniem między białkami surowicy a tzw. skonjugowanymi parami cząsteczek lub jonów. Autorzy ci użyli do badań niektórych frakcji białkowych surowicy zwierzęcej (albumin oraz frakcji II i III) oraz 2-metylooksy 6-chloro-9-/ 1-metyl-8-dietylaminooktyloamino-akrydyny. Związek ten w zależności od pH może dawać 4 formy jonów, z których dwie są naładowane podwójnie, a dwie pojedynczo. Wykazano, że albuminy i białka frakcji III-1 reagują tylko z pojedynczo naładowaną formą barwnika. Z tą samą formą reagują, ale w znacznie słabszym stopniu, białka frakcji II — głównie γ-globuliny.

Wpływ barwników akrydynowych na enzymy był przedmiotem badań Quastela i Wheatleya (4), którzy wykazali, że akryflawina hamuje zużycie tlenu przez E. Coli w obecności różnych substratów, takich jak glukoza (w 100%), mleczan (w 95%), bursztynian (w 45%), mrówczan (w 58%). Autorzy ci sugerowali, że zahamowanie oddychania przez barwnik może być wynikiem połączenia barwnika z enzymem znajdującym się w komórce bakteryjnej. To samo wykazano i w odniesieniu do tkanek mięśniowej i mózgowej (Manifold (5).

Podobny charakter miały badania Bovarnicka, Lindsaya i Hellermana (7), (8), (9), którzy badali metabolizm zarazków malarii i zmiany jakie w nim zachodzą pod wpływem atebryny. Autorzy ci stwierdzili, że zahamowane zostają przede wszystkim procesy fosforylacji związane ze spalaniem glukozy. Speck i Evans (6), wykazali znów, że atebryna hamuje heksokinazę i dehydrogenazę kwasu mlekowego, a Haas (32) stwierdził, że atebryna zapobiega tworzeniu się koenzymu reduktazy cytochromowej z fosforanu riboflawiny.

Z powyższymi badaniami są w pewnym stopniu związane badania nad wpływem barwników akrydynowych na drobnoustroje.

Albert i współpr. (33), (34), wykazali, że aktywność przeciwbakteryjna barwników akrydynowych zależy od stopnia jonizacji danego związku akrydynowego przy określonym pH. Massart (35) stwierdził znów, że dodane do środowiska kationy organiczne i nieorganiczne neutralizują działanie przeciwbakteryjne barwników akrydynowych.

Przeprowadzone przez nas doświadczenia obejmują dwie grupy zjawisk:1) wpływ barwników akrydynowych na białka surowicy i 2) wpływ barwników akrydynowych na niektóre enzymy.

Wydaje się, że obie te grupy zjawisk pozostają ze sobą w pewnym związku, ponieważ warunki w jakich zachodzi hamowanie ureazy przez barwniki akrydynowe, a częściowo także dehydrogenazy kwasu bursztynowego, są bardzo zbliżone do warunków w jakich zachodzi wytrącanie białek surowicy. Użyte do badań barwniki akrydynowe są barwnikami zasadowymi. Część barwna ich cząsteczki występuje w formie kationu. Potwierdzają to nasze badania nad zachowaniem się ich w polu elektrycznym, z których wynika, że nakroplone na papier barwniki w szerokim zakresie pH wędrują do katody. Zwiększenie szybkości ich wędrowania w środowisku kwaśnym, a zmniejszenie w środowisku zasadowym dowodzi ,że stopień ich jonizacji w dużym stopniu jest uzależniony od pH. Badania konduktometryczne przeprowadzone przy pH=7,2 wykazały znów, że przewodnictwo roztworów wszystkich czterech barwników maleje wprost proporcjonalnie ze zmniejszeniem się stężenia barwnika w roztworze. Jest to pośrednim dowodem na to, że nawet w największym z użytych przez nas stężeń barwniki są już całkowicie zjonizowane.

Otrzymane w naszych badaniach wyniki dotyczące barwników znajdują pełne potwierdzenie w pracach Alberta i wspł. (33), oraz w innych cytowanych powyżej. Zależność wytrącania białek surowicy od pH pozwala przypuszczać, że w procesie powstawania połączeń między białkami surowicy a barwnikami akrydynowymi dużą rolę odgrywają anionowe ugrupowania cząsteczek białka, a przede wszystkim grupy karboksylowe.

Jest powszechnie znane, że ze wzrostem stężenia jonów wodorowych w środowisku, maleje stopień dysocjacji grup karboksylowych. W tych warunkach nie stwierdza się także wytrącania białek przez barwniki akrydynowe. Wytrącanie zaś następuje

w tym zakresie pH, kiedy grupy karboksylowe są już w znacznym stopniu zjonizowane. Ewentualne znaczenie grup karboksylowych potwierdza jeszcze fakt, że wytrącone barwnikami akrydynowymi białko rozpuszcza się w kwaśnym środowisku. Należy więc przypuszczać, że w tych warunkach dodanie jonów wodorowych do środowiska cofa dysocjację grup karboksylowych czego następstwem jest uwolnienie się barwnika od białka. Działanie kationów nieorganicznych na proces wytrącania białek barwnikami akrydynowymi można również wyjaśnić w podobny sposób przyjmując, że jony te łącząc się z grupami karboksylowymi cząsteczki białka uniemożliwiają utworzenie się nierozpuszczalnego połączenia białko-barwnik.

Wydaje się, że aby mogło nastąpić wytrącenie białek przy pomocy barwników akrydynowych, musi być pewna określona ilość wolnych grup karboksylowych zdolnych do połączenia się z barwnikami akrydynowymi. Tym także należy tłumaczyć fakt, że w surowicy istnieje zespół białek nie dających wytrącić się przy pomocy barwników akrydynowych. Zespół ten obejmuje β i γ-globuliny, a więc najbardziej zasadowe białka wchodzące w skład widma białkowego surowicy. (P. I. dla β-globulin 5, 2, a dla γ-globulin — 6,4). (S t a n h a g e n) (36). W białkach tych, nawet w warunkach optymalnych dla procesu wytrącania białek surowicy barwnikami akrydynowymi, ilość grup karboksylowych jest widocznie nie wystarczająca do powstania nierozpuszczalnego połączenia między białkiem a barwnikiem akrydynowym. Przebieg wytrącania białek surowicy przy zmiennym pH przypomina w dużym stopniu przebieg wiązania się wapnia z białkami surowicy. Proces ten został szczegółowo opisany przez M a r t i n a, P e r k i n s a (37), C a r r a (38) oraz K a t z a i K l o t z a (39). Z prac tych wynika, że wapń tworzy kompleks z białkami i nie działa już wtedy jako jon. Uważa się, że połączenie wapnia z białkiem odbywa się poprzez wolne grupy karboksylowe drobiny białka, przy czym nie jest wykluczone, że i inne ugrupowania anionowe mogą w tym procesie brać również czynny udział. Zmiany pH wywierają duży wpływ na przebieg procesu wiązania się wapnia z białkami surowicy. Optimum wiązania zachodzi w granicach pH 7,0—7,8 a więc powyżej punktu izoelektrycznego dla wszystkich frakcji białkowych surowicy. Przy zakwaszaniu środowiska ilość

wiązanego przez białko wapnia spada. W środowisku alkalicznym znacznie powyżej P. I. wszystkich frakcji białkowych surowicy również następuje zmniejszenie powinowactwa białek surowicy do jonu wapniowego. Katz i Klotz (39) tłumaczą to zjawisko oddzieleniem się od siebie reszt hydroksylowych i karboksylowych białka w wyniku procesu pęcznienia. Tego rodzaju oddzielenie powoduje obniżenie wewnętrznego powinowactwa każdego z czynnych miejsc cząsteczki wobec kationów i w ten sposób niweluje wpływ zwiększonego przyciągania elektrostatycznego cząsteczki białka spowodowany wzrostem pH. Powyższe wyjaśnienie można również odnieść do analogicznego zjawiska w procesie wytrącania białek surowicy barwnikami akrydynowymi, gdzie również w środowisku wyraźnie zasadowym następuje spadek ilości wytrąconego białka, jako przejaw zmniejszonego powinowactwa barwnika do białka. Tutaj należy jednak uwzględnić jeszcze jeden czynnik mogący wpływać na spadek powinowactwa między barwnikiem a białkiem, a mianowicie zmniejszenie się stopnia dysocjacji barwnika jakie zachodzi w środowisku wyraźnie alkalicznym. Wg Alberta i wspł. (33) powyżej pH = 12 wszystkie użyte przez nas barwniki są jeszcze najwyżej w 50% zdysocjowane. Wg Irwina-Irwina (31) w warunkach tych następuje przejście podwójnie naładowanego kationu barwnikowego w formę naładowaną pojedynczo i w formę elektrycznie obojętną. Przebieg wytrącania białek surowicy różnymi stężeniami barwnika przy stałym pH, ale przy takim kiedy barwnik jest całkowicie zdysocjowany i kiedy ładunek ujemny cząsteczek białka jest dostatecznie duży, polega prawdopodobnie na stopniowym zobojętnianiu tego ładunku przez jony barwnika. Przy nadmiarze barwnika znak ładunku kompleksu barwnik — białko może zmieniać się na przeciwny, co sprzyja temu, że w tych warunkach może on nadal utrzymywać się w roztworze. Tego rodzaju wyjaśnienie zakłada jednak istnienie rozpuszczalnych połączeń między barwnikami akrydynowymi a białkami surowicy, czego jednak w sposób bezpośredni nie udało się dotychczas udowodnić. Nie jest jednak wykluczone, że nadmiar barwnika powoduje znaczniejsze zmiany w strukturze cząsteczek białka zmieniając niektóre jego własności fizyczne. Ten punkt widzenia potwierdza fakt, że pojawiające się w przesączu przy większych stężeniach barwnika frakcje białkowe zachowują się

nieco inaczej w polu elektrycznym niż frakcje surowicy kontrolnej. Wpływ jaki wywierają na proces wytrącania białek surowicy kationy nieorganiczne przypomina znów uderzająco zjawisko zaobserwowane przez Massarta (35), który wykazał, że zahamowanie oddychania drożdży przez trypaflawinę jest neutralizowane przy stałym pH przez dodanie do środowiska nieorganicznych kationów. Klasyfikując kationy według siły ich działania Massart (35) uważa, że decydującą rolę odgrywa tutaj wartościowość kationu. Najsłabiej działają kationy jednowartościowe, silniej zaś dwuwartościowe. Autor ten uważa także, że dodanie soli do środowiska nie może modyfikować jego pH i w ten sposób wtórnie wpływać na wiązanie się trypaflawiny z komórkami drożdży, ponieważ już wcześniej udowodniono, że ilość związanej przy stałym pH trypaflawiny zależy przede wszystkim od siły jonowej buforu. Massart (35) podkreśla również znaczenie anionowych ugrupowań białka wchodzącego w skład komórki drobnoustroju i twierdzi, że niezależnie od grup karboksylowych pewne znaczenie w procesie łączenia się trypaflawiny z białkiem komórki bakteryjnej mogą mieć także reszty wodorotlenowe tyrozyny.

Tego rodzaju zależność między wartościowością kationu a jego działaniem na proces wytrącania białek barwnikami akrydynowymi zaobserwowano i w naszych doświadczeniach. Stwierdzono, że zapobieganie wytrącaniu białek surowicy, jak też szybkość rozpuszczania białek już wytrąconych przez barwniki akrydynowe, są zależne od wartościowości kationu i od jego stężenia, a niezależne od tego z jakim anionem dany kation jest połączony. Uwzględniając wartość siły jonowej, która przede wszystkim zależy od ładunku elektrycznego obecnych w roztworze jonów, można uważać, że działanie roztworów o jednakowej sile jonowej jest mniej więcej jednakowe. Stwierdzenie tego faktu nie stoi absolutnie w sprzeczności z przytoczonymi wyżej poglądami Massarta (35), co wynika już ze znanego wzoru: $\mu = 0{,}5\ m.z^2$, gdzie: μ = siła jonowa, m = molarne stężenie jonu, z = jego wartościowość.

Wspomniano już wyżej, że nie zdołano na razie rozstrzygnąć zagadnienia czy istnieją rozpuszczalne połączenia między barwnikami akrydynowymi a białkami surowicy. Istnienie takich połączeń jest w zasadzie możliwe. Jeżeli założyć, że dysocjacja grup

karboksylowych wzrasta przy wzroście pH, to łączenie się kationów barwnikowych z grupami karboksylowymi może zachodzić znacznie wcześniej niż nastąpi wytrącanie białka. Czynnikiem utrzymującym tego rodzaju połączenia białko-barwnik w roztworze mogą być ładunki elektryczne kationowych ugrupowań w cząsteczce białka, które w punkcie izoelektrycznym nie będą całkowicie zobojętnione. Zobojętnienie może nastąpić dopiero powyżej punktu izoelektrycznego, a następstwem tego jest wypadnięcie połączenia barwnik-białko z roztworu. Frakcje białkowe surowicy niewytrącające się przy pomocy barwników akrydynowych również mogłyby występować w formie tego rodzaju połączeń. Można było przypuszczać, że przy powstawaniu połączeń między barwnikami akrydynowymi a białkami, analogicznie do połączeń białkowo-wapniowych, przynajmniej częściowo nastąpi zobojętnienie ładunku elektrycznego zarówno cząsteczek białka, jak też jonów barwnikowych co nie pozostaje bez wpływu na przewodnictwo całego roztworu. Przebieg konduktometrycznego miareczkowania roztworu białka riwanolem nie wykazał jednak żadnych różnic z przebiegiem konduktometrycznego miareczkowania roztworu NaCl posiadającego to samo przewodnictwo właściwe. Z dużym prawdopodóbieństwem można było przypuścić, że w tych stężeniach po dodaniu riwanolu zarówno jony Na i Cl, jak też i jony barwnika, występują niezależnie od siebie i niezależnie wpływają na przewodnictwo roztworu.

Konduktometryczne miareczkowanie roztworu riwanolu roztworem albumin również przebiegało identycznie, jak miareczkowanie albuminami roztworu NaCl. Wynika więc stąd, że kation akrydynowy z punktu widzenia przewodnictwa zachowuje się wobec białek podobnie jak jon sodowy. Mówiąc więc o połączeniach rozpuszczalnych między białkami a barwnikami akrydynowymi można mieć na myśli tylko połączenia tego samego typu jakie tworzyć mogą białko z kationem sodowym.

Przypuszczano również, że połączony z białkiem barwnik akrydynowy nawet w formie rozpuszczalnego kompleksu nie będzie dyfundował przez błonę dializującą, albo też będzie dyfundował znacznie wolniej niż barwnik rozpuszczony w wodzie. Przypuszczenie to okazało się w zasadzie słuszne, ponieważ barwnik znajdujący się w obecności białek zawsze dyfundował wolniej niż

barwnik rozpuszczony w wodzie. Wykazano to na przykładzie frakcji II i przy badaniu szybkości dyfuzji trypaflawiny znajdującej się w obecności albumin. Należy jednak zaznaczyć, że to zmniejszenie szybkości dyfuzji można wyjaśnić także działaniem samych białek gromadzących się po wewnętrznej stronie błony dializującej i utrudniających w ten sposób wydostanie się barwnika przez pory tejże błony.

Zwolnienie dyfuzji barwnika do roztworu NaCl może być spowodowane tym, że obecne w roztworze jony Na i Cl będą zajmować część otworków błony dializującej. Tego rodzaju wpływ jonów NaCl musi więc znacznie przewyższać ich działanie przyspieszające dyfuzję, spowodowane zmniejszeniem objętości płynu wewnątrz worka celofanowego.

Okazuje się więc, że przeanalizowanie uzyskanych wyników doświadczalnych pozostawia zagadnienie istnienia rozpuszczalnych połączeń między białkami a barwnikami akrydynowymi nadal nierozstrzygnięte. Z czterech użytych do badań barwników akrydynowych atebryna jest całkowicie nie aktywną wobec białek surowicy. Przy pomocy atebryny nie udało się wytrącić białek surowicy w całym, z przebadanych przez nas, zakresie pH, jak również w szerokim zakresie jej stężeń. Być może zjawisko to łączy się ściśle z jej słabym działaniem bakteriostatycznym, bowiem atebryna, jak podaje literatura, w odróżnieniu od riwanolu, akryflawiny i trypaflawiny wykazuje stosunkowo niski wskaźnik bakteriostatyczny wobec E. coli. Albert i współ. (33), wiążą ściśle aktywność bakteriostatyczną barwników akrydynowych ze stopniem ich jonizacji. Autorzy w odniesieniu do atebryny, która przy pH 7,3 jest również całkowicie zjonizowana, podnoszą pewne zastrzeżenia twierdząc, że zmiana przestrzennej struktury cząsteczki, związana z obecnością długiego łańcucha bocznego jest czynnikiem utrudniającym łączenie się atebryny z komórką bakteryjną. Ten sam punkt widzenia reprezentuje również Sexton (40).

Zestawienie przytoczonych wyżej faktów pozwala wysunąć przypuszczenie, że działanie bakteriostatyczne barwników akrydynowych wobec niektórych drobnoustrojów polega na połączeniu się barwnika z białkiem komórki bakteryjnej, w podobny sposób, jak przebiega łączenie się barwnika z białkami surowicy. Riwanol

i akryflawina, które w opisanych przez nas warunkach wytrącają białka surowicy, posiadają również wysoki wskaźnik bakteriostatyczny (20 i 22 wg Alberta (33) i współ.), zaś atebryna nie wytrącająca białek surowicy cechuje się niskim wskaźnikiem bakteriostatycznym (7 wg Alberta i współ. (33). Struktura przestrzenna jonu decyduje także w dużym stopniu o jego ruchliwości. Od ruchliwości jonu zależy szybkość wędrowania jonu w polu elektrycznym, jak również przewodnictwo jego roztworów. Z przebadanych barwników atebryna wędruje najszybciej w polu elektrycznym, a jej roztwory wykazują największe przewodnictwo. Można więc przypuszczać, że większa ruchliwość jonu barwnikowego nie sprzyja jego łączeniu się z białkiem i że utworzenie połączenia między barwnikiem możliwe jest tylko poniżej pewnej określonej wartości wyrażenia μ_K dla kationu barwnikowego. Należy jednak zaznaczyć, że związek zachodzący między ruchliwością kationu barwnikowego, a jego działaniem wobec białka surowicy czy też wobec drobnoustrojów może być zupełnie przypadkowy. Ta sama zmiana struktury może w danym przypadku powodować równoczesne obniżenie aktywności biologicznej i biochemicznej barwnika, a z drugiej strony zarówno obniżenie lub podwyższenie ruchliwości jonu barwnikowego.

W procesie powstawania połączeń między białkami a jonami dużą rolę odgrywa wzajemny wpływ poszczególnych frakcji białkowych na siebie. Poszczególne frakcje białkowe surowicy, które w zależności od pH mogą występować bądź w formie kationu bądź też anionu tworzą między sobą połączenia różniące się już własnościami od substratów, z których powstały. (Oncley i współ. (41), Steiner (42), Goldwasser, Putnam (43), (44), (45). Dlatego też niezależnie od punktów izoelektrycznych poszczególnych frakcji białkowych można wyodrębnić i inne punkty izoelektryczne, będące wypadkowymi punktów izoelektrycznych tychże frakcji (Vles, Rossier (46). Na istnienie skomplikowanych form, w jakich występują w ustroju koloidy zwrócił już uwagę Przyłęcki (47), wprowadzając do biochemii pojęcie sympleksów. Występowanie tego rodzaju połączeń uważał Przyłęcki (47) za zjawisko ogólnobiologiczne i przypisywał im wielką rolę w mechanizmie regulacji chemicznych procesów w ustroju. Wśród sympleksów wyróżnił on grupę czysto koloidowych, do których

zaliczył również sympleksy typu białko-białko. Przyłęcki zaznaczył również ,że sympleksy tego rodzaju różnią się znacznie w swych własnościach od monokomponentów, z których powstały. Zaobserwowane przez nas zjawisko współzależności między ilością wytrąconego przez barwniki akrydynowe białka a ilościowymi proporcjami między frakcjami albuminową i globulinową stoi prawdopodobnie w ścisłym związku z istnieniem połączeń między poszczególnymi frakcjami białek surowicy.

Stwierdzono bowiem, że czysta albumina inaczej zachowuje się wobec barwników akrydynowych w porównaniu z albuminą będącą składnikiem widma białkowego surowicy. Czysta albumina zachowuje się tak, jakby posiadała w cząsteczce raczej przewagę grup kationowych, a więc podobnie, jak wchodzące w skład widma białkowego surowicy β i γ-globuliny niewytrącające się barwnikami akrydynowymi. Można więc przypuszczać, że w zespole białek surowicy β i γ-globuliny działają w ten sposób, że zwiększają kwaśny charakter albumin, a odwrotnie albuminy zwiększają zasadowe własności β i γ-globulin. Te ostatnie bowiem będąc same w roztworze wytrącają się częściowo pod wpływem barwników akrydynowych. Bardziej szczegółowe wyjaśnienie tego zjawiska można podać opierając się na teorii Klotza i wspł. (48), (49), którzy przyjmują istnienie wiązań wodorowych między grupami hydroksylowymi oksyaminokwasów wchodzących w skład cząsteczki białka, a grupami karboksylowymi wzgl. aminowymi tejże samej cząsteczki, albo cząsteczek innych białek.

W poprzednim doniesieniu wyodrębniono zespół białek surowicy niewytrącający się barwnikami akrydynowymi jako osobną frakcję II. Poziom tej frakcji jest w pewnym stopniu zależny od rodzaju użytego barwnika akrydynowego. Frakcja II jest najmniejsza, jeżeli czynnikiem wytrącającym był riwanol. Przy użyciu trypaflawiny i akryflawiny poziom jej jest nieco wyższy. Dlatego też dla uniknięcia niejasności frakcję otrzymaną przy pomocy riwanolu oznaczono symbolem II-R. Przypuszczano, że oznaczenie poziomu tej frakcji składającej się w 33% z β-globulin i 67% z γ-globulin może być miernikiem zmian ilościowych, zachodzących w obrębie widma białkowego surowicy i dawać pewne wskazówki o charakterze rozpoznawczym i rokowniczym.

Wstępem do wykorzystania opisanych wyżej zjawisk w diagnostyce chemiczno-klinicznej było przeprowadzenie analizy statystycznej oznaczeń poziomu frakcji II-R wykonanych u 146 osób. Analiza statystyczna miała na celu ustalenie pewnych wartości, które należałoby przyjąć jako normę, a z drugiej strony miała wykazać współzależność między poziomem frakcji II-R a poziomem białek całkowitych w surowicy. Jako normę przyjęto dla frakcji II-R — średnią — 1,79% z odchyleniem standardowym 0,146 g%. Wyliczona wartość współczynnika korelacji r = 0,66 wskazuje na wyraźną współzależność między poziomem białek całkowitych w surowicy a poziomem frakcji II-R i pozwala przypuszczać, że niewytrącalna riwanolem część białek surowicy stanowi istotnie określoną frakcję białkową surowicy.

Ogólnie przyjęto bowiem, że współczynnik $r = 0$ oznacza całkowitą niezależność obu zmiennych, zaś $r = 1$ całkowitą ich współzależność. Jeżeli $r = 0,5$ lub więcej współzależność między zmiennymi jest wyraźna, gdy $0,5 < r < 0,3$ mniej wyraźna, a przy $r < 0,3$ niewyraźna.

Przeprowadzone badania nad wpływem barwników akrydynowych na enzymy zmierzały do ugruntowania stanowiska, że działanie tych związków polega przede wszystkim na działaniu ich na część białkową enzymu. Dlatego też w pracy niniejszej nie stosowano metod ogólnie przyjętych w enzymologii, a ograniczono się do fragmentarycznych badań, stosując metodę taką samą, jak przy badaniu białek surowicy. Przy optimum pH dla danego enzymu, przy stałym stężeniu substratu i enzymu, dodawano do środowiska zwiększające się ilości barwników akrydynowych a następnie, jeżeli aktywność enzymu zmieniała się, starano się usunąć wpływ barwnika przy pomocy NaCl.

Z czterech przebadanych enzymów dwa były właściwie nie wrażliwe na działanie barwników akrydynowych, a mianowicie: diastaza i trypsyna. Zachowanie się diastazy i trypsyny zależy prawdopodobnie od tego, że enzymy te należą do białek niewytrącających się barwnikami akrydynowymi. W odniesieniu do trypsyny należy przypuszczać, że stałe obniżenie jej aktywności jest uzależnione od działania barwników akrydynowych na kazeinę. Stwierdzono bowiem, że riwanol, akryflawina i trypaflawina w całym zakresie użytych stężeń wytrącają kazeinę. Wytrącanie kazeiny musi więc w pewien sposób zmieniać jej strukturę, co z ko-

lei może utrudniać dostęp enzymu do odpowiednich punktów cząsteczki substratu. Przypuszczenie to potwierdza fakt, że w obecności atebryny, która nie wytrąca kazeiny, trypsyna wykazuje tę samą aktywność proteolityczną co kontrola. Przebieg hamowania ureazy jest podobny do przebiegu wytrącania białek surowicy przez barwniki akrydynowe. Jedynie atebryna nie wytrąca ureazy i hamuje jej działanie tylko w ograniczonym zakresie stężeń. Zahamowania wywołanego przez atebrynę nie udało się usunąć przy pomocy NaCl. Natomiast w znacznym stopniu usunięto w ten sposób zahamowanie wywołane przez akryflawinę, trypaflawinę i riwanol. Można więc przypuszczać, że akryflawina, trypaflawina i riwanol działają na ureazę, jak na każde inne białko o własnościach frakcji I, tworząc z nią nierozpuszczalny w wodzie kompleks. Niemożność całkowitego odhamowania ureazy przy pomocy NaCl po zadziałaniu na nią barwnikami akrydynowymi wskazuje prawdopodobnie na to, że zajęcie anionowych ugrupowań części białkowej przez jony Na nie jest obojętne dla aktywności samego enzymu. Działanie barwników akrydynowych na dehydrogenazę kwasu bursztynowego różni się znacznie od działania ich na pozostałe z przebadanych enzymów. Użyte w niskich stężeniach riwanol, trypaflawina i akryflawina zwiększają aktywność preparatu enzymatycznego, a jedynie atebryna nie wykazuje tej własności. Z podobnym zjawiskiem aktywacji dehydrogenazy kwasu bursztynowego spotykamy się jeśli działamy na nią tzw. detergentami anionowymi, jak np. kwas taurocholowy względnie glikocholowy. Ten wzrost aktywności preparatu enzymatycznego tłumaczy Pihar (50) częściową denaturacją białka enzymatycznego, co doprowadza do ujawnienia się uprzednio zamaskowanych czynnych grup enzymu. Większe stężenia tych związków powodują głębiej sięgające zmiany strukturalne w preparacie enzymatycznym i wywołują już zahamowanie jego aktywności.

Zjawisko opisane przez Pihara (50) łączy się ściśle z wynikami badań Byerruma i współ. (51), którzy opisali wpływ różnych jonów na aktywność dekarboksylazy kwasu szczawiooctowego. Autorzy ci podkreślają, że małe zmiany stężeń elektrolitów w środowisku mogą wyraźnie wpływać na aktywność enzymów bądź w kierunku jej podwyższenia bądź obniżenia. Sposób działania tych jonów polega między innymi na tym, że zmieniają one ładunek elektryczny i stopień uwodnienia białka enzymatycznego,

co może doprowadzić do zmian strukturalnych cząsteczki enzymu, a w następstwie do zbliżenia lub oddalenia się od siebie jej aktywnych ugrupowań. Zjawiska tego rodzaju określane są jako tzw. „strukturalna regulacja czynności enzymów" i stanowią dziś jedną z podstawowych zagadnień jakimi zajmuje się biochemia. Należy zaznaczyć, że jednym z pierwszych, którzy zwrócili uwagę na istnienie tego rodzaju regulacji czynności enzymów był Przyłęcki (47), który trafnie zauważył, że aktywacja enzymów przez różne czynniki w istocie polega na zmianie struktury cząsteczki enzymu, bądź w pojęciu czysto przestrzennym, bądź też jako wynik reakcji PK $\rightleftarrows$ nMK (PK — polikomponent, MK — monokomponent).

Wydaje się, że zaobserwowane przez nas fakty należą do tej samej kategorii zjawisk i że aktywowanie dehydrogenazy kwasu bursztynowego przez barwniki akrydynowe polega również na zmianach przestrzennych białkowej części enzymu, wynikiem których jest inne ułożenie aktywnych ugrupowań względnie też ujawnienie się ugrupowań dotychczas ukrytych wewnątrz cząsteczki białka enzymatycznego. Mechanizm działania atebryny na dehydrogenazę kwasu bursztynowego jest inny niż pozostałych barwników akrydynowych. Świadczy o tym fakt, że atebryna nie wytrąca preparatu enzymatycznego, jak również, nie wywołuje jego aktywacji w warunkach w jakich aktywują preparat enzymatyczny riwanol, trypaflawina i akryflawina.

Być może, że atebryna hamuje aktywność SD działając nie na część białkową enzymu, a wpływając w pewien sposób na przebieg reakcji między częścią białkową enzymu a koenzymem flawinowym.

Na zakończenie należy podkreślić, że opisane przez nas zjawiska mogą nasunąć pewne sugestie co do działania barwników akrydynowych na ustrój ludzki. Jest ogólnie znane, że po podaniu większej ilości barwników akrydynowych do ustroju występować mogą powikłania związane z uszkodzeniem CSN i narządów miąższowych (52, (53), (54), (55) i (56). Uszkodzenia te można wyjaśnić wpływem jaki wywierają barwniki akrydynowe na enzymy i białka ustrojowe. Zaburzenia normalnych procesów enzymatycznych, zmiany struktury i stanu rozproszenia innych białek w komórce mogą doprowadzić do uszkodzenia narządu czy też tkanki i w koń-

cu do wystąpienia niepożądanych powikłań, często spotykanych przy stosowaniu barwników akrydynowych w lecznictwie.

Reasumując wyniki przeprowadzonych badań doświadczalnych dochodzimy do następujących wniosków:

1. Ilość białka wytrąconego z surowicy przy stałym pH zależy od stężenia barwnika.

2. Ilość wytrąconego białka z surowicy przy stałym stężeniu barwnika zależy od pH.

3. Atebryna nie wytrąca białek surowicy w całym zakresie użytych stężeń i w całym przebadanym przez nas zakresie pH.

4. Wytrącane przez barwniki akrydynowe białko daje się rozpuścić w 0,01 n roztworze HCl.

5. Sole nieorganiczne dodane do barwnika neutralizują jego wytrącające działanie na białka surowicy. Wpływ soli jest zależny od ich stężenia i od wartościowości ich kationu.

6. Wytrącone przez barwniki akrydynowe białko rozpuszcza się w roztworach soli nieorganicznych, przy czym szybkość rozpuszczania jest zależna od stężenia soli i od wartościowości ich kationu.

7. Szybkość rozpuszczania wytrąconego przez barwniki akrydynowe białka jest jednakowa w równocząsteczkowych roztworach soli o jednakowym kationie.

8. Szybkość dyfuzji przez błonę dializującą barwnika związanego częściowo z białkiem w postaci nierozpuszczalnego osadu jest największa jeżeli barwnik dyfunduje do środowiska, w którym znajduje się NaCl.

9. Szybkość dyfuzji barwnika rozpuszczonego w wodzie jest większa aniżeli barwnika obecnego w przesączu pozostałym po częściowym wytrąceniu białek surowicy.

10. Szybkość dyfuzji barwnika rozpuszczonego w wodzie jest większa aniżeli barwnika zmieszanego w worku celofanowym z albuminą surowiczą niewytrącającą się pod wpływem tego barwnika.

11. Przebieg konduktometrycznego miareczkowania albumin riwanolem jest taki sam, jak przebieg miareczkowania roztworu NaCl o tym samym przewodnictwie co roztwór albumin.

12. Przebieg konduktometrycznego miareczkowania roztworu riwanolu i roztworu NaCl o tym samym przewodnictwie przy pomocy roztworu albuminy, jest taki sam.

13. Barwnik niewytrącający białek surowicy (atebryna) charakteryzuje się największą szybkością wędrowania w polu elektrycznym, a jego roztwory wykazują najmniejszy opór właściwy. Barwnik najsilniej wytrącający białka surowicy (riwanol) najwolniej wędruje w polu elektrycznym i jego roztwory wykazują największy opór właściwy.

14. Ilość wytrąconego przez barwniki akrydynowe białka, szczególnie albumin, zależy od ilości obecnych w roztworze β i γ-globulin.

15. Istnieje zespół białek surowicy niewytrącający się barwnikami akrydynowymi w całym zakresie użytych stężeń i w całym zakresie pH. Zespół ten nazwano frakcją II.

16. Poziom tej frakcji w surowicy wykazuje znacznego stopnia współzależność z poziomem białek całkowitych.

17. Barwniki akrydynowe nie wywierają żadnego wpływu na aktywność diastazy.

18. W obecności barwników akrydynowych, niezależnie od ich stężenia, krystaliczna trypsyna wykazuje jednakowe obniżenie aktywności proteolitycznej.

19. Barwniki akrydynowe hamują aktywność ureazy. Hamowanie to jest zależne od stężenia barwnika w środowisku. Hamujące działanie barwników akrydynowych można częściowo neutralizować przez dodanie do środowiska odpowiedniej ilości NaCl.

20. Barwniki akrydynowe wywierają wpływ na aktywność dehydrogenazy kwasu bursztynowego. Małe stężenia riwanolu, akryflawiny i trypaflawiny aktywują enzym a dopiero większe hamują częściowo jego działanie. Atebryna wywiera tylko hamujące działanie. Dodanie do środowiska NaCl powoduje również zahamowanie aktywności SD. Mniejsze stężenia NaCl, które same nie hamują enzymu, nie wywierają również wpływu na działanie barwników akrydynowych na SD.

PIŚMIENNICTWO

1. Gorodskaja O. — Biochimia 15. 507, 1950. 2. Ryżkow W., Smirnowa W. — Mikrobiologia 17. 3. 267, 1948. 3. Hořejši J. — Čas. Lek. Česk. 91. 704, 1952. 4. Quastel J., Wheatley A. — Bioch. J. 25. 629, 1931. 5. Manifold H. — Brit. J. Exper. Pathol. 22. 111, 1941. 6. Speck J., Evans A. — J. Biol. Chem. 159. 83, 1945. 7. Bovarnick M., Lindsay A., Hellerman L. — J. Biol. Chem. 163. 523, 1946. 8. Bovarnick M., Lindsay A., Hellerman L. — J. Biol. Chem. 163. 535, 1946. 9. Hellerman L., Lindsay A., Bovarnick M. — J. Biol. Chem. 163. 553, 1946. 10. Krawczyński J. — Pol. Tyg. Lek. 9. 311, 1954. 11. Cohn E. — Blood 1. 6, 1946. 12. Gaede W. — Organisch - chemische Nomenclatur, Amsterdam 1948. 13. Mitchell H. — British chemical nomenclatur, London 1948. 14. Northrop J. — Cristalline enzymes 1948. 15. Ball E., Anfinson C., Cooper O. — J. Biol. Chem. 168. 257, 1947. 16. Kingsley G. — J. Lab. Clin. Med. 27. 840, 1942. 17. Flynn F., Da Mayo P. — Lancet 261. 235, 1951. 18. Krystosik J. — 1953 (Niepublikowane). 19. Slater R., Kunkel H. — J. Lab. Clin. Med. 41. 619, 1953. 20. Opptl J., Kutacek M., Lošticki C., Cizinsky J. — Čas. Lek. Česk. 92. 625, 1953. 21. Krawczyński J., Rycaj M. — Pol. Tyg. Lek. IX. 656, 1954. 22. Ardry R. — Ann. de Biol. Clin. 10. 575, 1952. 23. Zvoniček J. — Fysikalni prostroje w chemicke laboratore, Praha 1948. 24. Slavik K., Smeta'na R. — Chem. Listy (w druku) 1952. 25. Krawczyński J., Rycaj M. — 1953 (niepublikowane). 26. Hořejši J. — Zakl. Chem. Vyšetřovani ve vnitř. lekařstvi. Praha 1949. 27. Slavik K., Smetana R. — Chem. Listy (w druku) 1952. 28. Pihar O. — Chem. Listy. 46. 379. 1952. 29. Sörensön S. — Etudes enzymatiques. Comp. rend. de Lab. Carlsberg, 7. V. cz. 1. 2. 3. 1907. 1908, 1910. 30. Pečenka J., Raška K. — Čas. Lek. Česk. 92. 340, 1953. 31. Irwin J., Irwin E. — J. Biol. Chem. 196. 651. 1952. 32. Haas E. — J. Biol. Chem. 155. 321, 1944. 33. Albert A., Rubbo S., Goldacre R., Dawey M., Stone J. — Brit. J. Exp. Path. 26. 160, 1945. 34. Rubbo S., Albert A., Maxwell M. — Brit. J. Exp. Path. 23. 69. 1942. 35. Massart L. — Bull. Soc. Chim. Biol. 34. 1145, 1952. 36. Stanhagen — cyt. wg Bladergoena — Physikalische Chemie in Medizin und Biologie. Basel 1945. 37. Martin N., Perkins D. — Bioch. J. 47. 323, 1950. 38. Carr H. — Arch. Bioch. Bioph. 44. 351, 1953. 39. Katz S., Klotz T. — Arch. Bioch. Bioph. 44. 351, 1953. 40. Sexton W. — Chemical constitution and biolog. activity. London 1949. 41. Oncley J., Ellenbogen E., Gitlin D., Guard F. — J. Psych. Chem. (Easton), 56. 85, 1952. Exc. med. 6. 471. 2187, 1953.

42. Steiner R. — Arch. Bioch. Bioph. 47. 56, 1953. 43. Goldwasser E., Putnam F. — J. Phys. Colloid. Chem. 54. 79, 1950. 44. Sandor G., Sabetay V., Vargues. — Bull. soc. Clin. Biol. 35. 273, 1953. 45. Turner E., Boyer P. — Arch. Bioch. 37. 353, 1952. 46. Viles K., Rossier J. — Cyt. wg Bladergoena. 47. Przyłęcki St. — Enzymologia 3. 153, 1937. 48. Klotz I. — Amino acids and proteins XIV. 189, 1950. 49. Klotz I., Urquart J. — A. Amer. Chem. Soc. 71. 1597, 1949. 50. Pihar O. — Chem. Listy (w druku) 1952. 51. Byerrum R., Brown St., Ball Ch. — Arch. Bioch. 26. 442, 1950. 52. Supniewski J. — Farmakologia, Kraków 1947. 53. Hořejši J. — Choroby jaterni, Praha 1947. 54. Tesar J. — Prak. Lek. 33. 36, 1953. 55. Hermann F., Miller O. — Acta Derm. Wenerol. 32. 304, 1952. 56. Cullinvan E. — Lancet. i . 218, 1931.

Ob. Doc. Dr med. Zakrzewskiemu z Instytutu Hematologii dziękuję uprzejmie za użyczone mi preparaty albumin i globulin.

РЕЗЮМЕ

В связи с вопросом „структурной регуляции метаболизма" и основываясь на проблеме белково-ионных соединений, автор занялся обследованием влияния акридиновых катионов на белки сыворотки. Для опытов автор использовал следующие производные акридина: риванол (2,5—диамино—7-этоксу-акридин), трипафлавин (2,8-диамино-10 метил-хлоракридин), акрифлавин (2,8-диамино-10 метил хлоракридин хлороводорода смешанный с 2,8-диамино-акридина в отношении 1:3) и атебрина (2-хлор-5) 4-диэтиламино 1-метил (бутил-амино-7 метоксиакридин). Установлено, что три первых красителя в определенных экспериментальных условиях вызывают осаждание белков сыворотки, причем самыми сильными свойствами в этом отношении обладает риванол. Атебрин же совершенно не осаждает белков сыворотки. На основании произведенных опытов показано, что осаждание белков сыворотки зависит от концентраций красителя, концентрации ионов водорода в среде, от структуры самой молекулы красителя и характера замещающих групп, а также от физико-химических свойств отдельных белковых фракций. Процесс же осаждания белков сыворотки не зависит от температуры.

Путем электрофореза установлено, что найбольшей чувствительностью на осаждающее действие риванола обладает альбуминовая фракция, затем — α — глобулиновая и часть β — глобулиновой фракции. Второй части β — глобулиновой фракции и γ глобулинов вовсе не удается осаждать при помощи акридиновых красителей.

Далее автор представляет вероятный механизм процесса осаждания сывороточных белков с помощью акридиновых красителей, исходя из положения, что белково-акридиновый комплекс осаждает лишь тогда, когда его электрический заряд равняется нулю. Это имеет место только тогда, когда у нас дело с более кислыми белками. Вследствие этого в сыворотке были обособлены две фракции: фракция I, состоящая из более кислых

белков и осаждающаяся под влиянием акридиновых красителей, и фракция II, в состав которой вошли более щелочные белки, а в которой при воздействии на нее акридиновыми красителями явление осажданния не выступало.

Обозначание уровня акридиновых фракций в сыворотке крови при типе течения различных заболеваний может быть использовано с большим успехом для диагностических целей. В настоящей работе автор дает статистический анализ результатов полученных при обозначании фракции II-R в сыворотках здоровых лиц, и указывает на взаимосвязь уровня этой фракции с уровнем не обособлённых белков, учитывая и тот факт, что на процесс осаждания белков при помощи акридиновых красителей оказывает влияние количественное соотношение отдельных белковых фракций, выступающих в данной сыворотке. По всей вероятности имеем дело с симплексами типа белок — белок, обладающими иного рода физико-химическими свойствами, чем монокомпоненты, из которых они состоят.

Дополнением исследований автора над белками сывороток является изучение воздействия акридиновых красителей на некоторые энзимы. Установлено, что активность диастазы и трипсина в основном не подвергается подавлению, активность же уреазы и дегидрогеназы янтарной кислоты под влиянием акридиновых красителей сильно модифицируется. Автор рассматривает также и возможный механизм этого явления, приходя к убуждению, что акридиновые красители действуют по существу не на весь энзим, а лишь на его белковую часть и что только в исключительных случаях могут иметь характер специфического действия. На основании аналогий, выступающих в действии акридиновых красителей на микроорганизмы, энзимы и белки сывороток, можно предполагать, что подавление роста микроорганизмов некоторыми акридиновыми красителями является результатом возникания белково-ионных соединений между акридиновыми катионами а белками бактерийной клетки. Непосредственным доказательством этому может служить факт взаимной конкуренции неорганических катионов по отношению к анионовым группировкам белка, описанным Массартом по отношению к микроорганизмам и наблюдаемый автором по отношению к белкам сыворотки и к уреазе.

SUMMARY

In connection with the problem of „structural regulation of metabolism" and on the basis of the problem of proteinionic compounds the influence of acridine cations on serum proteins was studied. The following acridine derivatives were used in the studies: rivanol (2,8 diamino-7 etoxyacridine), trypaflavin (2,8 diamino-10 methylchloroacridine), acriflavin (2,8 diamino-10 methylchloroacridine of hydrochlorine mixed with 2,8 diaminoacridine in proportion 1:3) and atebrine (2 chlorine-5-) 4 diethylamino 1-methyl (buthylamino-7 metoxyacridine). It was found that the first three of the above mentioned stains under certain experimental conditions precipitate proteins of the serum, whereby the strongest properties of precipitation has rivanol. Atebrine does not precipitate at all serum proteins. On the basis of the conducted experiments it was proved, that precipitation of proteins of the serum depends on the concentration of the stain, on the concentration of hydrogen ions in the medium, on the structure of the stain and the character of the substituting groups and on the physico-chemical properties of the separate protein fractions. The process of precipitation of proteins of the serum does not depend on temperature.

Electrophoretic examinations proved, that the most sensitive to the precipitating power of rivanol is the albumin fraction, next the α-globulin part of the β-globulin fraction. The second part of the β-globulin fraction and γ-globulins cannot at all be precipitated by the use of acridine stains. In the discussion the author describes the presumable mechanism of precipitation of serum proteins by acridine stains, whereby he assumes, that the acridine-protein complex is precipitated, when its electric charge equals zero. Such case takes place only in an event, if there are available more acid proteins. Therefore two fractions were isolated from the serum. The I fraction consisting of more acid proteins and precipitated by the use of acridine stains and the II fraction, which includes

proteins more basic, and which are not precipitated by the use of acridine stains. Determination of the level of the acridine fraction in the serum in the course of various diseases may have a diagnostic value. In the present work a statistic analysis of results obtained in the course of determination of the fraction II-R in the sera of healthy persons was made and it was pointed to the correlation of the level of this fraction to the level of total proteins and into consideration was also taken the fact, that the process of precipitation of proteins with acridine stains is also influenced by the mutual quantitative relation of the separate protein fractions, which occur jointly.

Most likely, it is a case of symplexes of the type protein-protein, which is characterized by other physico-chemical properties, than the monocomponents, of which they are composed.

The work on serum proteins is completed by examinations conducted on the influence of acridine stains on some enzymes. It was found, that activities of diastase and trypsine were fundamentally not inhibited. Activities of urease and dehydrogenase of succinic acid are, however, by acridine stains highly modified. The presumable mechanism of the phenomenon is described and it was concluded that the action of acridine stains on enzymes is basically an action on the protein part of the enzyme and only in an exceptional case it may be a specific action. Analogies, which are between the action of acridine stains on microorganisms, enzymes and serum proteins allow to suppose, that the inhibition of growth of microorganisms by some acridine stains is also the result of a formation of a protein-ionic union between acridine ions and proteins of the bacterial cell. A direct proof of this is the fact of mutual concurrence of unorganic cations as regards anionic groups of proteins, described by M a s s a r t in relation to microorganisms and observed by the author as regards to serum proteins and urease.

Papier druk. sat. III kl. 80 g Format 70 x 100 Ark. druku 3+6 str.
Annales U. M. C. S. Lublin 1954. Lub. Druk. Prasowa—Lublin, Buczka 12. Zam. 545 27.I.1955 r.
850 egz. A-6-3092 Data otrzymania manuskryptu 27.I.1955 r. Data ukończenia druku 15.VII.55.